



Isolierung und Analyse eines Bindungsglobulins für Herzglykoside aus Rinderblut

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Justus-Liebig-Universität

Eingereicht von
Dipl.-Chem. Holger Kost
geboren am 09 April 1969
in Butzbach

Giessen 2001

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	5
1.1	Einführung	5
1.2	Die Natriumpumpe als Herzglykosid-Rezeptor	7
1.3	Herzglykoside sind auch Steroidhormone der Wirbeltiere	8
1.3.1	Die chemische Struktur von Herzglycosiden	9
1.3.2	Endogene Herzglykoside	11
1.4	Transport von Herzglykosiden und Steroidhormonen im Blut	16
1.5	Zielsetzung der Arbeit	20
2	<i>Materialien und Methoden</i>	21
2.1	Verwendete Abkürzungen	21
2.2	Verwendete Geräte	23
2.3	Verwendete Chemikalien	23
2.4	Chromatographische Methoden	24
2.4.1	Niederdruckflüssigkeitschromatographie (LC)	24
2.4.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	31
2.5	Elektrophoretische Methoden	33
2.5.1	SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese) nach Lammeli	33
2.5.2	Präparative Gelelektrophorese	38
2.5.3	Western Blot	39
2.5.4	Molmassenbestimmung durch Auswertung der Gelelektrophorese	39
2.5.5	Zweidimensionale Elektrophorese	40
2.6	Protein-Konzentrationsbestimmung	41

2.6.1	Proteinbestimmung nach Lowry	41
2.6.2	Proteinbestimmung nach Bradford	44
2.6.3	Proteinbestimmung nach Warburg	45
2.7	Bestimmung der Protein-Herzglycosid Affinität mittels Tryptophan-Quenching	47
2.8	Peptidgewinnung und Analyse	49
2.8.1	Spezifische Spaltung von Proteinen mit Bromcyan	49
2.8.2	Spezifische enzymatische Spaltung mit den Endoproteinasen Trypsin und Lys-C	49
2.8.3	Identifizierung des N-Terminus von Proteinen durch »Edman-Abbau«	50
2.9	Immunologische Methoden	52
2.9.1	Herstellung spezifischer polyklonaler Antikörper	52
2.9.2	Verwendung spezifischer polyklonaler Antikörper	54
2.9.3	Affinitätsmarkierung mit dem Protein-reaktiven Herzglycosidderivat N-hydroxysuccinidyl-3-o-methylcarbonyl- α -aminocaproat und Detektion der Markierung mittels Digoxin- Antikörper	57
3	Resultate	61
3.1	Proteinreinigung	61
3.1.1	Orientierende Reinigung des Herzglykosid-Bindungsproteins	61
3.1.2	Kationenaustauscherchromatographie an CM-Sephadex C 50	62
3.1.3	Kationenaustauscherchromatographie an einer Resource-S Säule	63
3.2	Chemische und immunologische Charakterisierung des gereinigten Herzglykosidbindungsproteins (1 Version der Reinigung)	68
3.2.1	Herstellung und Eigenschaften von Kaninchen-Antikörpern gegen das Herzglykosidbindungsprotein	68
3.2.2	Proteinchemische Charakterisierung des gereinigten Herzglykosidbindungsproteins:	69

3.3	Reinigung des Herzglykosidbindungsproteines (CGBG) unter Einschluß einer Affinitätschromatographie an einer CGBG-Antikörper-Säule	72
3.3.1	Affintätsreinigung an einer CGBG-Antikörpersäule	72
3.3.2	Weitere Reinigung des CGBG an einer DEAE Säule (FPLC)	73
3.3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der Reinigung durch Affinitätschromatographie (2. Version der Reinigung)	75
3.4	Untersuchung der Proteinstruktur des Herzglykosidbindungsproteins	77
3.4.1	Untersuchung der Molekülmasse mittels Gelfiltration	77
3.4.2	Bestimmung des isoelektrischen Punktes (IEP)	79
3.4.3	Bestimmung einzelner Aminosäuresequenzen durch Edman-Abbau	80
3.4.4	Untersuchung spezifischer Spaltmuster einiger Enzyme	83
3.4.5	Untersuchung des Glycosylierungsmusters des Herzglykosidbindungsproteins	84
3.4.6	Untersuchung der Funktion des Herzglykosidbindungsproteins	86
4	Diskussion	91
5	Zusammenfassung	98
6	Summary	100
7	Anhang	102
7.1	Danksagung:	102
7.2	Lebenslauf	103
7.3	Publikationsliste	104
8	Literaturverzeichnis	105

1 Einleitung

1.1 Einführung

Herzglykoside werden seit über 200 Jahren gezielt für die Bekämpfung der Herzinsuffizienz eingesetzt, seitdem der am General Hospital in Birmingham arbeitende Arzt William Withering sein berühmtes Buch "An Account of the Foxglove and Some of its Medical Uses" 1785 in London veröffentlichte [1]. Das Verdienst Witherings in der Digitalistherapie liegt darin begründet, daß er klare Indikationen für eine Therapie mit Herzglykosiden erarbeitete und daß er ein Behandlungsschema aufstellte.

Herzglykoside wurden wahrscheinlich schon seit Jahrtausenden für die Therapie verschiedener Krankheiten verwendet. Die Wirkstoffgruppe war bereits den Ägyptern bekannt, wie die Erwähnung der Herzwirkung der Meerzwiebel im Papyrus Elbers 500 vor Christi Geburt zeigt. Die Therapie wurde vermutlich von den Römern übernommen. Herzglykoside des roten Fingerhuts wurden im Mittelalter für unterschiedliche Zwecke in der Medizin eingesetzt. Erst Withering ist es gelungen, klare Indikationen für die Verwendung der Inhaltsstoffe des Fingerhuts (Digitalis) herauszuarbeiten und zu zeigen, daß sie eine harntreibende Wirkung über eine Verstärkung der Kontraktionskraft des kranken (insuffizienten) Herzens haben und die Herzschlagfrequenz herabsetzen. Nach einer euphorischen Periode der Verwendung der Digitalisglykoside in der Medizin und einer Zeit der beinahe stereotypen Anwendung bei der Therapie des insuffizienten Altersherzens ist in den vergangenen Jahrzehnten die Therapie mit Herzglykosiden stark zurückgegangen. Wie die "Digitalis Investigation Group" ermittelt hat, verbessert eine langzeitige Digoxintherapie zwar die Symptome der Herzinsuffizienz und die Lebensqualität der Patienten, verlängert aber nicht die Überlebensdauer [2], wie dies für andere Medikamente belegt ist. Herzglykoside sind schwierig zu dosieren, da ihre therapeutische und toxische Wirkung eng beieinander liegen. Sie werden derzeit nur für die Therapie der linksventrikulären Dysfunktion aufgrund von Vorhofflimmern und bei schwerer Herzinsuffizienz (NYHA III und IV) empfohlen [3].

Da Herzglykoside therapeutisch schwierig zu handhaben sind, haben verschiedene Wissenschaftsschulen vorwiegend im deutschsprachigen Raum (Mannich, Meyer; Reichstein, Ruzicka, Tschesche, Wieland, Windaus) versucht, die chemische Natur der Inhaltsstoffe von *Digitalis purpurea*, *Digitalis lanata* und anderer Pflanzen aufzuklären [4,5]. Bei dieser Arbeit sind mehr als 200 verschiedenen Herzglykoside, die alle Steroidderivate sind, entdeckt und in ihrer Struktur aufgeklärt worden. Man hat bei dieser Arbeit gefunden, daß die Substanzklasse der Herzglykoside in der Natur weit verbreitet ist. Herzglykoside werden nicht nur im Pflanzenreich, sondern auch bei Wirbeltieren (Kröten und Schlangen) [4,6] gefunden. Die Herzglykoside unterscheiden sich nicht nur in ihrer chemischen Struktur, sondern auch in ihrer Pharmakodynamik, d.h. in ihrer Resorptionsgeschwindigkeit aus dem Magen-Darmtrakt und in ihrer Metabolisierungsgeschwindigkeit, bzw. Eliminationsgeschwindigkeit, über die Leber und die Niere [7].

Auch die Einführung chemisch reiner cardiotoner Steroide (wie z.B. Digoxin) in die Therapie und die Überprüfung ihrer richtigen Dosierung mit immunologischen Methoden [8] haben die Dosierungsschwierigkeiten nicht beseitigt. Es ist zwar jetzt möglich, einen Bereich zu definieren, in dem Herzglykoside therapeutisch bzw. toxisch wirken, jedoch überlappen sich beide Bereiche individuell weit. Diese breite Zone beruht auf einer unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber Herzglykosiden [9]. Die Ursache hierfür ist unbekannt. Es bleibt derzeit offen, ob der hormonelle Status der Patienten, wie z.B. das Ausmaß der Sekretion endogener Herzglykoside oder spezifischer Herzglykosid-Bindungsproteine (siehe unten), die Therapie mit Herzglykosiden beeinflusst. Beeinflussen könnte die Herzglykosidtherapie auch das Expressionsmuster der Isoenzyme der Natriumpumpe. Die Natriumpumpe wird als Rezeptor für Herzglykoside angesehen [11,12]. Man hat in Analogie zu anderen Steroidhormonen versucht, durch Derivatisierung Moleküle mit größerer therapeutischer Breite zu erhalten. Alle Versuche der Pharmazeutischen Industrie, solche Moleküle zu synthetisieren, sind jedoch gescheitert. Dieser Weg wurde daher aufgegeben.

1.2 Die Natriumpumpe als Herzglykosid-Rezeptor

Herzglykoside sind spezifische Hemmstoffe der Natriumpumpe der Plasmamembran bzw. ihres biochemischen Äquivalents, der Na^+/K^+ -ATPase [10]. Die Natriumpumpe wird allgemein als der Herzglykosidrezeptor angesehen [11,12]. Dieses integrale Membranenzym besteht aus der katalytischen α -Untereinheit von 100 kDa und dem Glykoprotein der β -Untereinheit von ca. 50 kDa. Die Na^+/K^+ -ATPase transportiert unter ATP-Hydrolyse zu ADP und anorganischem Phosphat 3 Na^+ -Ionen aus der Zelle und 2 K^+ -Ionen in die Zelle hinein. Die Natriumpumpe ist somit elektrogen und dafür verantwortlich, daß die Plasmamembran innen negativ gegenüber der positiv geladenen Aussenseite der Plasmamembran ist. Die Natriumpumpe kommt in mehreren Isoformen der α - und β -Untereinheiten vor, die sich in ihrer Affinität gegenüber Herzglykosiden unterscheiden [13,14,15]. Während der α_1 -Isoenzymtyp in allen Zellen gefunden wird, findet sich der viel Herzglykosid-empfindlichere α_2 - und α_3 - Isoenzymtyp in den Nervenzellen, dem Reizleitungssystem des Herzens und in den Herzmuskelzellen. Als Hemmstoffe der Na^+/K^+ -ATPase führen Herzglykoside vermutlich über eine vorübergehende Erhöhung des cytosolischen Na^+ im Bereich der Plasmerosomen (dem diffusionsbegrenzten Bereich zwischen Plasmamembran und sarcoplasmatischem Reticulum, in dem bei Ratten und Mäusen die besonders Herzglykosid-sensitive α_2 Isoform der Na^+/K^+ -ATPase vorkommt [16,17]) katalysiert durch den Na/Ca-Austauscher zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} . Diese lokale Ca^{2+} -Erhöhung führt zu einer vermehrten Aufnahme des Ca^{2+} in das sarcoplasmatische Reticulum, von wo bei einer Muskeleerregung vermehrt Ca^{2+} freigesetzt wird, was zur verstärkten Kontraktion des Herzmuskels (Inotropie) führt [18] (Abbildung 1-1). Herzglykoside wie das Ouabain (g-Strophanthin) können jedoch auch zur Kontraktur der glatten Muskulatur der Gefäße und dadurch zu einer Erhöhung des Blutdruckes führen. Die Hemmung der Natriumpumpe des Reizleitungssystem ist eventuell für die bradykarde Wirkung der Herzglykoside von Bedeutung.

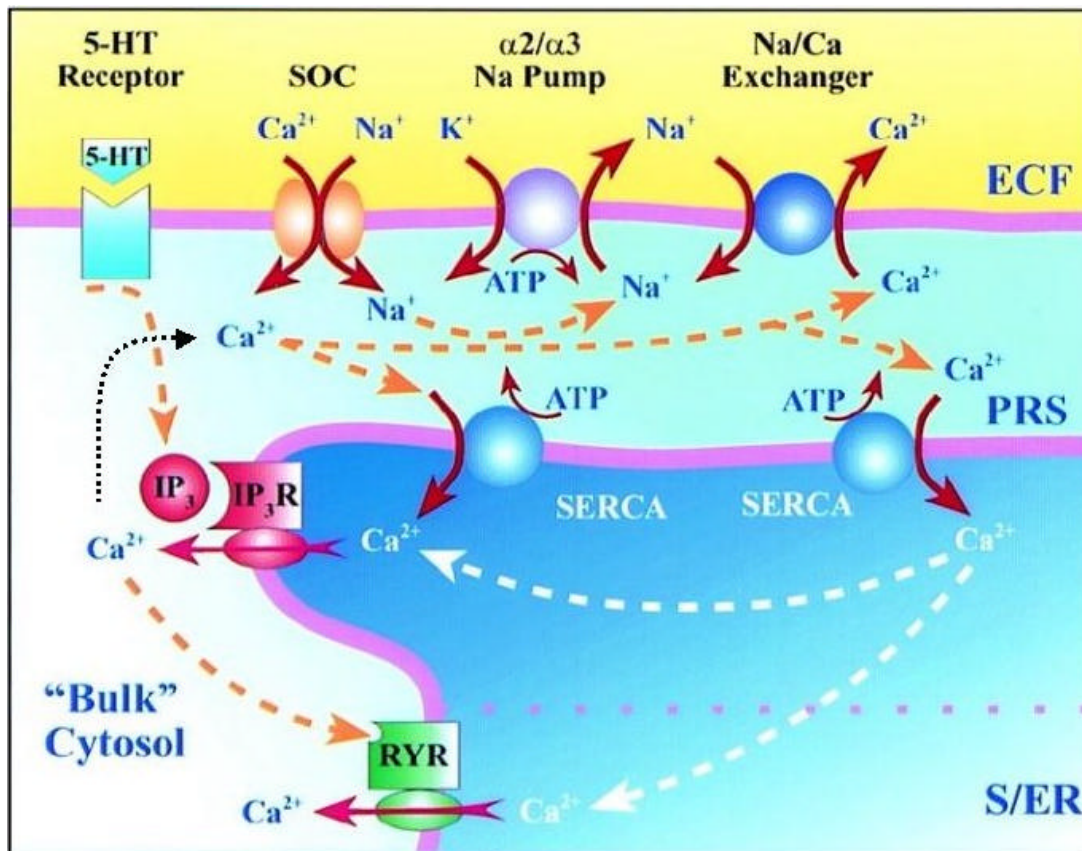


Abbildung 1-1 Plasmerosom als spezielle Einheit der Herzmuskelzelle, die für die positive inotrope Wirkung auf den Herzmuskel verantwortlich ist [18, 17].

1.3 Herzglykoside sind auch Steroidhormone der Wirbeltiere

Herzglykoside sind Steroidderivate [4]. Wegen ihrer die Herzkraft verstärkenden Wirkung werden sie auch kardiotope Steroide genannt. Bisher wurden sie eher als Inhaltsstoffe bestimmter Pflanzen angesehen [5], die den Sinn haben, die Pflanzen vor dem Gefressenwerden zu schützen. Die medizinisch therapeutische Wirkung des pflanzlichen Wirkstoffes wurde eher als ein nützliches Kuriosum angesehen. Es wurde vergessen, daß kardiotope Steroide auch in niederen Wirbeltieren vorkommen [4], wo sie - da sie von spezifischen Drüsen der Haut gebildet werden und als Sekrete in der Hautoberfläche landen - vermutlich ebenfalls die

Funktion haben, Kröten und Schlangen vor dem Gefressenwerden zu schützen. Kröten sind daher giftig [19]. Die Inhaltsstoffe dieser Krötensekrete werden in den chinesischen Pharmakopoe seit Jahrhunderten unter der Bezeichnung Chan'su als Herzmittel eingesetzt. Die europäische Pharmakologie und Medizin hat bisher versäumt zu hinterfragen, wieso Gifte von Kröten und Pflanzen mit herzaktiver Wirkung einen spezifischen Rezeptor in der Natriumpumpe auf allen Zellen der Wirbeltiere vorfinden, und wieso es zu dieser spezifischen Abstimmung kommt. Eine Möglichkeit wäre, daß die Substanzgruppe der kardiotonen Steroide wie eine Reihe anderer pflanzlicher Wirkstoffe als Hormon bzw. als Neurotransmitter wirkt. Dies ist z.B. für die Wirkung von Morphinum bzw. den Endorphinen [20], für Cannabinoide [21] und Nikotin [22] bekannt.

1.3.1 Die chemische Struktur von Herzglycosiden

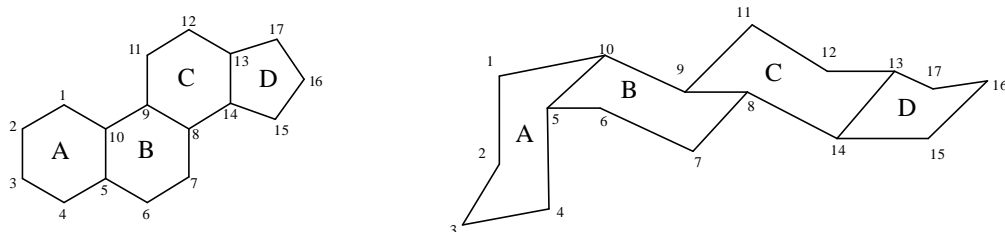


Abbildung 1-2 Das Grundgerüst der Steroide

Herzglykoside gehören zur Klasse der Steroide [4]. Ihr gemeinsames Merkmal ist das Kohlenstoff-Gerüst des Gonans (Abbildung 1-2), welches ein Teil des Cholesterinmoleküls ist, aus dem die Herzglykoside in ihrer Biosynthese gebildet werden [5]. In den Herzglykosiden sind im Gegensatz zu den Steroidhormonen der A- und B-Ring cis-, B- und C-Ring trans- und C und D-Ring wiederum cis-verknüpft [4,5]. In den Steroidhormonen sind dagegen A/B und C/D-Ringe trans-verknüpft. Herzglykoside unterscheiden sich von den Steroidhormonen darin, daß am C-Atom 14 eine OH-Gruppe in β -Stellung und am C-Atom 17 des D-Ringes ebenfalls in β -

Stellung einen ungesättigten Lactonring tragen. Aufgrund der Substitution an der C17-Position können alle kardiotoxischen Steroide entweder der Gruppe der Cardenolide oder der Bufadienolide zugeordnet werden. Cardenolide besitzen am C-17 einen fünfgliedrigen α,β -ungesättigten Lactonring und Bufadienolide einen sechsgliedrigen, α,β -und γ,δ -zweifach ungesättigten Lactonring. (Abbildung 1-3).

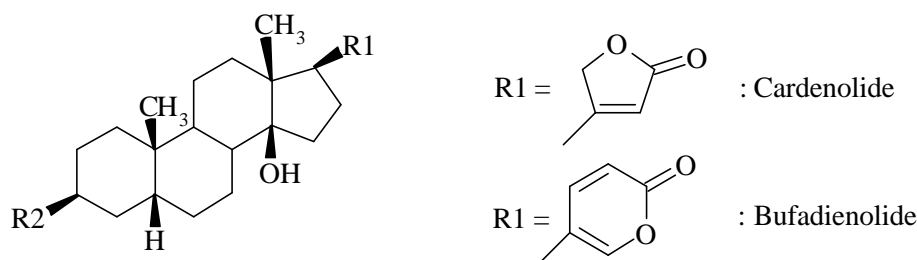


Abbildung 1-3 Die zwei Stoffklassen der Herzglycoside

Obwohl die Herzglykoside seit einer langen Zeit als Arzneimittel in Gebrauch sind, ist der Weg der Biosynthese dieser Substanzgruppe noch in vielen Details unklar. Sicher ist, daß in den Pflanzen die Biosynthese von Pregnenolon und Progesteron ausgeht. Progesteron wird sodann in das 5β -Pregnan-3,20-dion überführt, von dem aus die 14β -OH-Gruppe unter Bildung des 5β -Pregnan-3 β ,14 β -diol-20-on eingeführt wird (Abbildung 1-4). Aus ihm wird durch Einführung einer zusätzlichen OH-Gruppe am C21 das 5β -Pregnan-3 β ,14 β ,21-triol-20 und unter Verwendung von Malonyl-CoA das Digitoxigenin (Abbildung 1-4). Im Gegensatz zur Biosynthese der Cardenolide, die von Progesteron startet [23], scheint die Biosynthese der Bufadienolide in den Kröten von den Gallensäuren als Vorläufermolekül auszugehen [24]. Die Details dieser Biosynthese liegen bei der Substanzgruppe der Bufadienolide noch mehr im Dunkeln als bei den Cardenoliden.

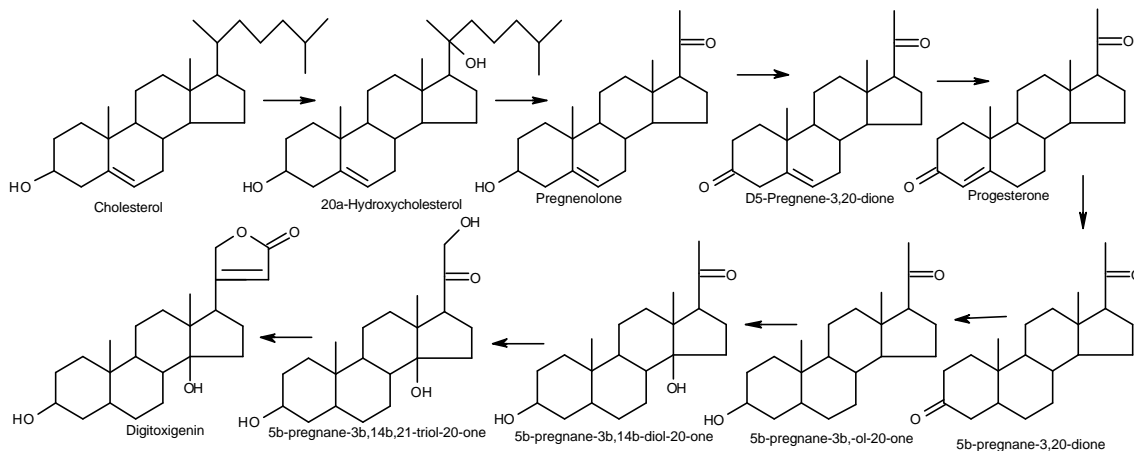


Abbildung 1-4 Die Bildung von Digitoxigenin aus Progesteron [23]

Ein wesentliches Charakteristikum der Herzglykoside ist, daß viele der kardiotoenen Steroide an der C3-OH-Gruppe des A-Ringes 1 bis 4 Zuckermoleküle glykosidisch gebunden haben. Diese Zucker sind zumeist seltene Zucker wie Digitoxose, Rhamnose, Cymarose. Diese Zucker haben der gesamten Substanzgruppe den Namen "Herzglykoside" gegeben. Abbildung 1-5 zeigt die Glycoside der Cardenolid-Reihe Ouabain und Dogoxin, sowie der Bufadienolid-Reihe Proscillaridin A, 1,9-Norbufalin und Marinobufagenin.

1.3.2 Endogene Herzglykoside

Unter dem positiven Eindruck der Digitalistherapie bei Herzinsuffizienz wurde schon vor über 100 Jahren angenommen, daß es endogene Herzglykoside gäbe. Diese Vorstellungen wurden 1953 von dem unbekannten Biochemiker Albert Szent-Györgyi mit dem Postulat der Existenz eines endogenen Digitalis erneuert [25]. Die intensive Suche nach einer derartigen Substanz, die an der Regulation des Blutdrucks und der Volumenregulation beteiligt sein sollte [26], hat erst in jüngster Zeit zur Isolierung einer Reihe von endogenen Herzglykosiden geführt, die vielfach

schon seit vielen Jahren in anderem Zusammenhang bekannt waren. Sie sind in (Abbildung 1-5) aufgeführt. Man hat inzwischen endogene Cardenolide und endogene Bufadienolide nachgewiesen:

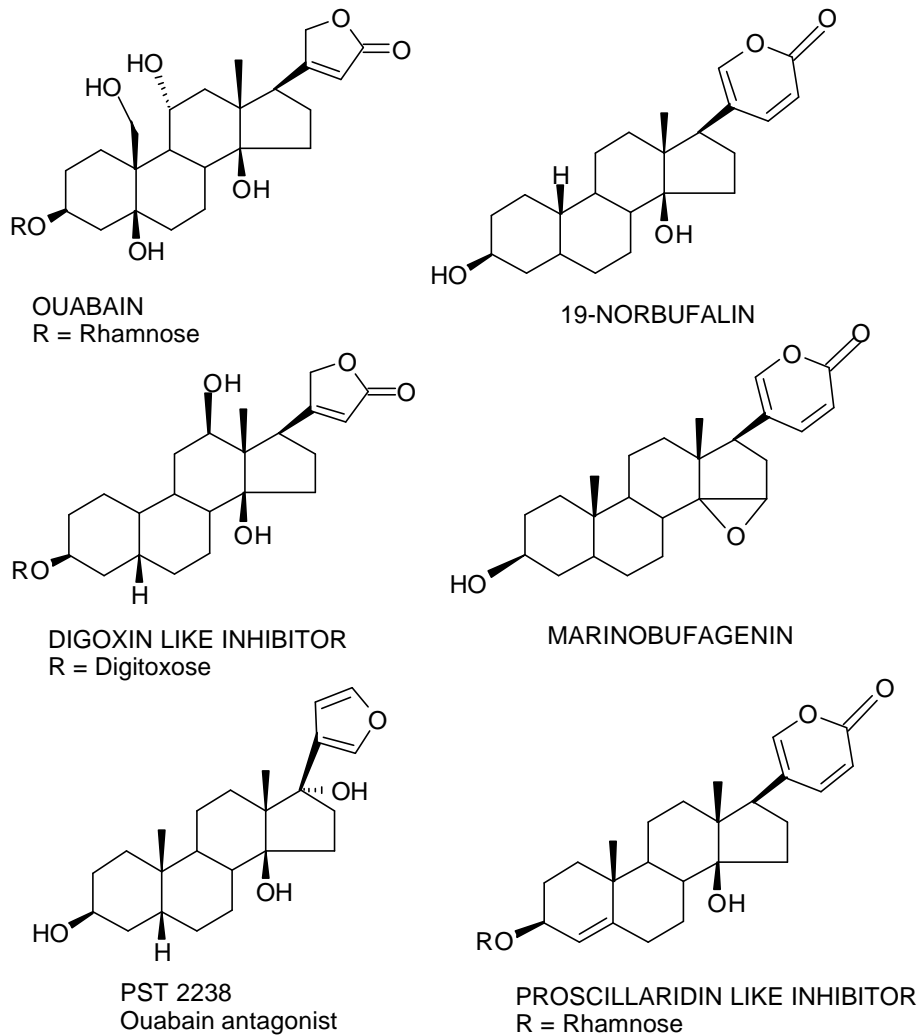


Abbildung 1-5 Auf der Suche nach endogenem Digitalis entdeckte man Herzglykoside in Säugetieren. PST 2238 ist ein synthetisch hergestelltes Ouabain-Analog, das den Blutdruck senkt.

1.3.2.1 Endogenes Ouabain

Ouabain konnte in den letzten Jahren von drei verschiedenen Labors bei der Suche nach „endogenem Digitalis“ aus Geweben von Mensch und Rind isoliert werden: Der Arbeitsgruppe von Hamlyn (Baltimore) gelang es als erster aus 80 L menschlichem Blutplasma eine Substanz zu isolieren, die massenspektrometrisch von Ouabain nicht zu unterscheiden war. Allerdings konnte die Existenz eines Isomers des Ouabain nicht ausgeschlossen werden [27]. Schneider et al. (Gießen) gelang es 1998 als erster Gruppe 16 µg eines reinen Inhibitors der Natriumpumpe aus 20 kg Nebennieren des Rindes zu isolieren und die Struktur mit ¹H-NMR und der Massenspektrometrie zu charakterisieren. Die Analyse ergab, daß es sich bei dem Hemmstoff um Ouabain handelte [28], eine Substanz die Arnaud schon 1888 aus dem afrikanischen Pfeilgift des Ouabaio Baums (*Acocanthera ouabaio*) kristallisiert hatte [29] und die 1932 von Jacobs und Bigelow (33) in seiner Struktur aufgeklärt worden war [30]. Ein Jahr später zeigte die Arbeitsgruppe von Hauptert und Nakanishi (Boston/New York), daß es sich bei dem aus dem Hypothalamus des Rindes isolierten "hypothalamisch inhibitorischen Faktor (HIF)" ebenfalls um Ouabain handelte [31]. Sie korrigierte damit frühere Aussagen, daß es sich bei der Substanz um ein Isomer des Ouabain handele [32,33].

Endogenes Ouabain wird in der Zona fasciculata der Nebenniere gebildet [34] und aus kultivierten Nebennierenzellen durch ACTH und Angiotensin II freigesetzt [35,36]. Die durch Angiotensin II stimulierten Signalwege zur Freisetzung von Aldosteron und Ouabain sind verschieden: Nur die Angiotensin II-induzierte Freisetzung von Ouabain wird durch den AT₂-Antagonisten PD 123319 unterbunden [36], die des Aldosteron bleibt jedoch erhalten. Progesteron und Pregnenolone sind in vitro in Zellen der Nebennierenrinde Vorläufer der Biosynthese von Ouabain [37,38]. Nebennieren wacher Hunde sezernieren Ouabain [39]; es wird unter Kreislaufbelastung vermehrt im Plasma gefunden [40] Endogenes Ouabain ist im Nabelschnurblut Neugeborener [41] und unter den Bedingungen des Hochdruckes erhöht. Etwa 50% der Kaukasier mit einem erhöhten Blutdruck zeigen auch erhöhte Konzentrationen an endogenem Ouabain [42]. Normotone Menschen haben eine Blutkonzentration von $0,16 \times 10^{-9}$ - $0,7 \times 10^{-9}$ M Ouabain, die bei Herzinsuffizienz auf $1,59 - 3 \times 10^{-9}$ M ansteigt [43] (sie liegt somit im gleichen Bereich wie die für die Digoxin-Therapie empfohlene Plasmakonzentration

von $0.6 - 2.5 \times 10^{-9}$ M [44]). Beim Menschen führt Ouabain in einer Konzentration von 1.3×10^{-8} bei der arteriellen Infusion in den Unterarmen zur Vasokonstriktion [45]. Für eine de novo Synthese von Ouabain in der Nebenniere des Menschen sprechen auch Tumore mit Ouabain-Überproduktion (Ouabainome), deren Entfernung die Ouabainspiegel und den Bluthochdruck auf Normalwerte senken [46,47]. Adrenalektomie bei Ratten senkt die Konzentration des endogenen Ouabains im Blut [48].

Für eine Beteiligung endogenen Ouabains an der Entstehung des Bluthochdrucks spricht auch die Beobachtung, daß langzeitige Gaben kleiner Dosen von Ouabain an Ratten zur Ausbildung eines Bluthochdrucks führten [49,50] Gaben kleiner Dosen von Digoxin jedoch führten nicht zur Ausbildung eines Bluthochdrucks, sondern sogar zur Senkung des Ouabain-induzierten Bluthochdrucks der Ratten [51,52]. Es wird spekuliert, daß diese blutdrucksenkende Funktion des Digoxin auf einer Hemmung der blutdrucksteigernden Wirkung des Sympathicus-Systems beruht [51,52]. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, daß langfristige Medikation von Hochdruckratten mit niedrigen Konzentrationen des Digitoxigeninderivats PST 2238 (Abbildung 1-5) den Blutdruck ebenfalls senkt [53,54].

1.3.2.2 Endogenes Digoxin

Die Arbeitsgruppe von Goto isolierte aus dem Harn des Menschen eine von Digoxin nicht zu unterscheidende Substanz [55]. Allerdings mag diese Substanz auch leicht unterschiedlich aussehen; denn Valdes und Mitarbeiter isolierten aus Nebennieren des Rindes eine mit Digoxin-Antikörpern kreuzreagierende hydrophobe Substanz, die leicht unterschiedlich in der reversed Phase-HPLC eluierte als Digoxin [56]. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß diese Substanz deglykosiliert werden kann [57] und in seine Dehydroform durch Sättigung des Lactonrings überführt werden kann [58]. Endogene Substanzen, die mit Digoxin-Antikörpern reagieren, wurden bei Nierenversagen, im Nabelschnurblut Neugeborener und bei Bluthochdruck in der Schwangerschaft erhöht gefunden [59]. Die Digoxin-Immunoreaktivität ist nach erschöpfender Kreislaufbelastung [60] und im akuten Herzinfarkt erhöht [61]. Infusion von Fab-Fragmenten von Digoxin Antikörpern senkt bei Menschen und Ratten den erhöhten Blutdruck [62,63,64].

1.3.2.3 Endogenes Marinobufagenin

Zusätzlich zu endogenen Cardenoliden ist auch die Existenz endogener Bufadienolide bei Säugern nachgewiesen worden. Das Bufadienolid Marinobufagenin ist aus dem Urin von Patienten mit akutem Herzinfarkt isoliert worden. Es wird beim Herzinfarkt verstärkt ins Blut freigesetzt [65]. Marinobufagenin ist vasokonstriktiv [66] und zeigt erhöhte Blutkonzentrationen bei Patientinnen mit Präeklampsie [67]. Bei Hypoventilation steigt seine Konzentration im Blut ebenfalls an [68]. In Ratten bewirkt ACTH-Gabe einen 2-fachen Anstieg des endogenen Marinobufagenins [69]. Auch mit dem Plasmavolumen und der Natriumkonzentration steigt die Marinobufagenin-Sekretion ins Blut an. Da es eine größere Affinität für die $\alpha 1$ -Isoform der Na^+/K^+ -ATPase als für das $\alpha 3$ -Isoenzym [70] hat und da die $\alpha 1$ -Isoform das in den Tubuluszellen der Niere vorkommende Isoenzym ist, scheint die Substanz ein Kandidat für das von DeWardener [26] postulierte "Natriuretische Hormon" zu sein [71].

1.3.2.4 Endogenes 19-Norbufalin

19-Norbufalin wurde aus menschlichen Katarakt-Linsen isoliert, wo es vermutlich für die Ausbildung des grauen Stars verantwortlich ist [72]. 19-Norbufalin vermindert die Expression des intrazellulären Signalproteins 12-3-3, aber nicht die Expression des Linsenproteins γ -Kristallin [73]

1.3.2.5 Weitere endogene Herzglykoside

Neben den hier aufgeführten endogenen Herzglykosiden scheint es weitere in ihrer Struktur noch nicht aufgeklärte Substanzen mit kardiotoner Wirkung zu geben: Sich et al. fanden bei Hochdruckpatienten einen Anstieg einer Kreuzreaktivität gegen das pflanzliche Bufadienolid Proscillaridin A [74]. Das mit Proscillaridin-A-Antikörpern kreuzreagierende Material ist in der Nebennierenrinde und im Hypothalamus in erhöhten Konzentrationen vorhanden [75].

1.4 Transport von Herzglykosiden und Steroidhormonen im Blut

Die Erkenntnis, daß Herzglykoside in der Nebenniere und dem Hypothalamus von Säugetieren gebildet werden können, ist neu. Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Xie und Askari zeigen in der Tat, daß das relativ gut wasserlösliche Ouabain über die Natriumpumpe als Rezeptor eine Signalkaskade anstoßen kann, die z.B. in Herzmuskelzellen in Kultur über die Beteiligung der MAP-Kinase-Kaskade in der vermehrten Expression von α -Aktin und des atrialen natriuretischen Peptids und der Repression der $\alpha 3$ -Isoform der Natriumpumpe resultiert [76]. Auch die Hemmung der Expression des intrazellulären Signalproteins 12-3-3 in den Linsenzellen durch 19-Norbufalin [73] spricht in der gleichen Richtung. Bisher wurden die Herzglykoside als Wirkstoffe pflanzlichen Ursprungs angesehen. Da Herzglykoside wie Digoxin, Digitoxin oder Gitalin wasserunlöslich sind und nach der Resorption aus dem Magen-Darmtrakt über das Blut zum Herzen gelangen müssen, wurde angenommen, daß Herzglykoside wie viele andere wasserunlöslichen Wirkstoffe gebunden an Albumin im Blut transportiert werden [77]. Bestimmt man jedoch die therapeutischen Herzglykosid-konzentrationen im Blut und vergleicht sie mit den Dissoziationskonstanten des Herzglykosid-Albuminkomplexes, dann registriert man, daß die Dissoziationskonstanten der Albumin-Herzglykosidkomplexe weit über den therapeutisch bedeutsamen Herzglykosid-Plasmakonzentrationen liegen. Folglich kann Albumin weder für die Therapie mit Herzglykosiden noch für die physiologische Funktion schlecht wasserlöslicher endogener Herzglykoside von Bedeutung sein.

Wenn eine Substanz wie Digoxin ein Steroidhormon ist [55], das von der Nebenniere sezerniert wird [56], dann sollte der Transport dieses Steroidhormons im Blut ähnlich wie bei anderen Steroidhormonen geschehen. Steroidhormone werden zumeist spezifisch an spezielle Bindungsproteine und weniger spezifisch an Albumin gebunden im Blut transportiert (Tabellen 1.1 und 1.2). In Tab. 1.1 sind einige bekannte Transportproteine aufgeführt. Solche Bindungsproteine werden in den meisten Tierarten gefunden. Ihre eigentliche physiologische Rolle wird jedoch auch nach bald 30-jähriger intensiver Arbeit immer noch nicht verstanden [78]. Das Corticosteroidbindungsglobulin (CBG) wurde im Blutplasma von allen Säugetieren

gefunden und charakterisiert [79]; es wurde aber auch als intrazelluläres Protein in Gebärmutterzellen nachgewiesen [80].

Alle Steroidhormone binden an Albumin mit hoher Kapazität, aber sehr schlechter Affinität (Tabelle 1.2). Darüber hinaus gibt es im Plasma Steroidbindungsproteine mit niedriger Kapazität, aber hoher Affinität, wie TTR (Präalbumin oder Transthyretin), die spezifischen Globuline Thyroxinbindungsglobulin (TBG) [81,82,83,84], Corticosteroidbindungsglobulin [85,86] oder Transcortin (CBG), das Sexualhormon-(Testosteron/Oestradiol)bindungsglobulin (SHBG) und Vitamin-D-Bindungsprotein (DBP) [87]. Steroidbindungsproteine des Plasmas besitzen eine hohe Affinität für ihr Hormon ($K_D \sim 10^{-9}$ - 10^{-8}). Einige Bindungsproteine besitzen eine außerordentlich hohe Spezifität (TBG ist für T_4 stereospezifisch und bindet nur an L - T_4), während andere keine Spezifität zeigen (Albumin kann L - T_4 und D - T_4 binden) [88]. Die Bindungsspezifität muß nicht absolut sein; denn an das Corticosteroidbindungsglobulin binden mehrere strukturähnliche Hormone. So kann TBG die Schilddrüsenhormone mit T_4 , T_3 und rT_3 interagieren und SHBG eine Reihe von Sexualhormonen und auch deren Derivate binden (Tab. 1-2).

Tabelle 1.1-1 Steroidhormonbindungsproteine im Serum

Name	Abkürzung	Hormone
Corticosteroidbindungsglobulin	CBG, Transcortin	Cortisol, Progesteron
Sexsteroidbindungs-Plasmaprotein	SBP, TeBG, SHBG	(Dihydro-) Testosteron, Oestradiol
α -Fetoprotein (Murine)	α -FP	Oestradiol, Oestron
Progesteronbindungsprotein	PBP	Progesteron
Androgenbindungsprotein (Testes)	ABP	(Dihydro-) Testosteron
Vitamin D-Bindungsprotein	DBP	1(-25)(di)-Hydroxycholecalciferol

Tabelle 1.1-2 Assoziationskonstante (K_a) der Steroidhormone in Humanserum [89]

K_a (mol/l)	Albumin	TTR	TBG	CBG	SHBG	DBP
Thyroxin (T_4)	$0,5-1 \times 10^6$	5×10^7	2×10^{10}			
Triiodthyronin	1×10^6	2×10^7	2×10^8			
Cortisol	3×10^3			$3-8 \times 10^7$		
Corticosteron	1×10^4			8×10^7		
Aldosteron	$0,2-5 \times 10^4$			$0,2-4 \times 10^7$		
Progesteron	6×10^4			2×10^7		
Dihydrotestosteron	$3-4 \times 10^4$				3×10^9	
Testosteron	$3-4 \times 10^4$			$0,5 \times 10^7$	1×10^9	
Östradiol	$3-6 \times 10^4$				$1-5 \times 10^8$	
Vitamin D3						4×10^{-7}

Für eine physiologische Funktion der Sexualhormonbindungsproteine spricht, daß sich die Konzentration der Bindungsproteine mit der Tierart und ihrem physiologischen Zustand ändert. Während der Gravidität steigt die Konzentration an [90]. Das PBP (Progesteron-Bindungsprotein) wird in der Plazenta des Schweins produziert und zirkuliert mit der Konzentration von $20 \mu\text{M}$ im mütterlichen Organismus, ist aber nicht im Fetus vorhanden [91,92].

Als Syntheseort wurde für SBP und CBG Leberzellen, für PBP die Plazentazellen des Schweins entdeckt. CBG wurde in der Gebärmutter, in Hypophyse, Niere, Schilddrüse, Lymphe (aber nicht in allen Geweben) nachgewiesen und SBP in Prostata, Endometrium und wahrscheinlich Plazenta [93]. DBP wird von der Leber sezerniert [78].

Über die biologische Funktion der Bindungsproteine für Hormone besteht noch kein Einigkeit: Es ist klar, daß freie Hormone Wirkungen auf die Zielorgane haben. Somit bleibt zu fragen, ob an Bindungsprotein gebundene Steroidhormone verlangsamt abgebaut werden, als Komplex mit einem Transportprotein leichter die Kapillarwand passieren, oder eventuell erst auf der Oberfläche von Zellen nach Bindung an einen spezifischen Rezeptor dissoziieren, sodaß sie als freies Hormon verfügbar werden [94]. Darüber hinaus existieren jedoch insbesondere für das Sex-Binding-Protein spezifische Daten, die annehmen lassen, daß der ternäre Komplex zwischen Steroidhormon-Bindungsglobulin und zellmembranständigen Rezeptor auch als Start einer Signalkaskade dienen kann (Abbildung 1-6).

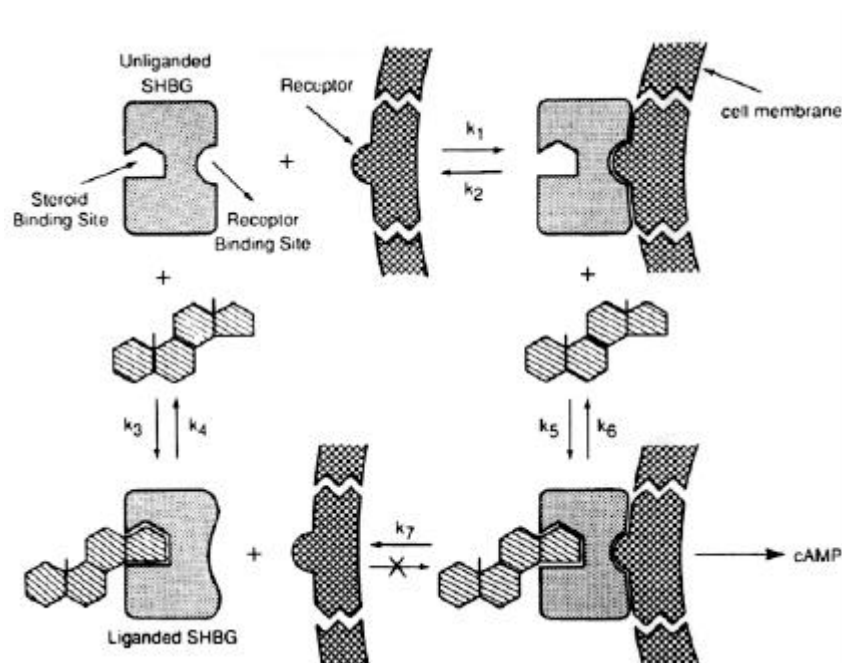


Abbildung 1-6 Bindungsmodell von Rosner [86]

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Es ist mittlerweile weitgehend sicher, daß Herzglykoside nicht nur ein Wirkstoff pflanzlichen Ursprungs sind [95], welcher aus unbekannten Gründen von Schlangen und Kröten als Abwehrstoff verwandt wird [96], sondern vielmehr Hormone des Kochsalz- und Wasserhaushaltes sind, die von der Nebenniere und dem Hypothalamus abgegeben werden [97]. Diese Erkenntnis hat die Blickrichtung auf die Gruppe der Herzglykoside und ihre physiologische Bedeutung erneut ins Blickfeld gebracht. Wenn Herzglykoside als eine neue Art von Mineralocorticoiden in das Blut abgegeben werden sollten, dann sollte es für sie auch, wie für alle anderen Steroidhormone bekannt ist, ein spezifisches Bindungsprotein geben. Dieses Bindungsprotein sollte über Affinitäten im Bereich der Blut-Serumkonzentrationen verfügen. Erste eigene Untersuchungen haben gezeigt, daß solch ein Protein im Rinderblut und Krötenblut vorkommen [98]. Das Bindungsprotein aus Krötenplasma sollt ein Molekulargewicht von 48-53 kDa haben. Kürzlich haben auch Komiyama et al. durch Affinitätschromatographie an einer Ouabain-Säule ein Protein von 14.4 kDa aus menschlichem Blutserum isolieren können, das sie als Plasmin-generiertes Bruchstück eines Ouabain-Bindungsprotein aus Fc-Anteil des menschlichen IgG1 der schweren Kette, denn die durch Ouabain gehemmte Teilung von THP-1-Zellen wurde durch Plasmin-generiertes Fc aufgehoben [96].

Die bisher existierenden Angaben über die Natur und die Eigenschaften des Bindungsproteines für Herzglykoside im Blut sind somit sehr widersprüchlich. Es war daher die Aufgabe dieser Arbeit, das Herzglykosidbindungsprotein zu reinigen und es hinsichtlich seiner chemischen Natur und seiner Eigenschaften zu charakterisieren, sowie spezifische Antikörper gegen das Protein zu erzeugen, damit als nächste Stufe ein quantitativer Test für die Gewebebestimmung und die eventuelle Isolierung des Gens aus einer Gewebekbank möglich werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 *Verwendete Abkürzungen*

Abb.	Abbildung
Abs.	Absorbtion
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AO	Anthrolyouabain
AP	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
BW	Blindwert
C	Konzentration
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
cFA	Komplettes Freundsches Adjuvans
CGBG	Cardiac Glycoside Binding Globuline (Herzglykosidbindungsprotein)
CM	Carboxymethyl
d	Tag
Da	Dalton
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
ED	Endogenes Digitalis
EDLS	Endogenous Digitalis-Like Substance (endogene Digitalis-ähnliche)
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation Massenspektroskopie
Ext.	Extinktion
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HDMA	N-hydroxysuccinimidyl-digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- γ -amino-caproate
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

	(Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IgG	Immunglobulin der Subklasse G
IgG-AP	IgG, an das alkalische Phosphatase kovalent gebunden ist
IgG-POD	IgG, an das Peroxidase kovalent gebunden ist
IgM	Immunglobulin der Subklasse M
K _D	Dissoziationskonstante eines Substrates
kDa	Kilodalton
Log	Logarithmus zur Basis 10
M	molar (Mol/l)
MALD-TOF	Matrix-assisted-LASER-Desorption Time-of-Flight Massen Spektroskopie
min.	Minute
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid - oxidiert
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid - reduziert
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NC	Nitrocellulose
OAc	Acetat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
p-NPP	para-Nitrophenylphosphat
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat (Natrium-Dodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese
SP	Sulfopropyl
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-Buffered-Saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBST	Tris-Buffered-Saline-Tween
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Upm	Umdrehungen pro Minute

UV	Ultraviolett
vis	Visuell (sichtbat)

2.2 *Verwendete Geräte*

Filterphotometer	Eppendorf (Hamburg)
Fluoreszenzspektrometer L-3000	Hitachi (Japan)
Fraktionsammler 2070 Ultrovac II	LKB Instruments (Gräfelfing)
Kühlbox mit Flüssigkeitsumlaufkühlung	Colora GmbH (Lorch)
Kühlzentrifugen RC2B/RC5B	DuPont GmbH (Bad Nauheim)
Spektralphotometer Lambda 2	Perkin Elmer (Überlingen)
Wasserbad 2764	Eppendorf (Hamburg)
Vortex REAX 2000	Heidolph (Kelkheim)
Diaflow Ultrafiltrations-Zelle	Pall-Filtron (Dreieich)
Einmal-Filterhalter, 0,45 µm	Schleicher/Schüll (Dassel)
FPLC-Anlage	Pharmacia (Freiburg)
HPLC-Anlage 1	GAT-LC1110 + GBC
HPLC-Anlage 2	Merck-Hitachi 6200 (Darmstadt)

2.3 *Verwendete Chemikalien*

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer Mannheim (Mannheim), Serva (Heidelberg), Sigma (München), Merck AG (Darmstadt) und Riedel de Häen (Hannover) in der höchsten käuflichen Reinheit bezogen. Lab-Trol Proteinstandard stammte von der Firma Merz & Dade (München). Es wurden folgende chromatographischen Säulen eingesetzt: Pharmacia Resource-S, 1ml; Phenomenex Jupiter C5, 250 x 4,5 mm; Phenomenex BioSep DEAE; LKB TSK G-4000 sw, 600 x 7,7 mm. Säulenmaterialien: Pharmacia CM-Sephadex; Pharmacia CNBr-aktivierte Sepharose. Die Reinstwasserversorgung erfolgte über eine Milli-Q-Anlage der Firma Millipore (Eschborn).

2.4 Chromatographische Methoden

2.4.1 Niederdruckflüssigkeitschromatographie (LC)

2.4.1.1 Kationenaustauscher: CM-Sephadex C 50 (Carboxymethyl-Kationenaustauscher auf Sepharosebasis)

Materialien

kühlbare Säule: Höhe: 50 cm; Durchmesser: 5 cm; Volumen: 1 Liter

UV/Vis-Spektrometer: *Perkin Elmer*: Lambda 2

Säulenmaterial: CM-Sephadex C 50, *Pharmacia*

Lösungen

Waschpuffer: 50mM Glycin; pH 8,0; 150 mM NaCl ; Elutionspuffer: Puffer A pH 10,0

Packen der Säule

25 g trocknes Säulenmaterial wird unter langsamem Rühren in zwei Liter dest. Wasser gelöst. Die nach 1-2 Stunden erhaltene homogene Suspension wird in eine bei +4°C gekühlte Säule gefüllt. Nach dem Absetzen des Säulenmaterials werden die leichten, nicht abgesetzten Bestandteile (Fines) abgesaugt und anschließend der untere Abfluß der Säule geöffnet .

Vor dem Auftragen der Probe wird die Säule 12 Stunden bei 0,5 ml/min mit Waschpuffer equilibriert.

Betrieb der Säule

Die Säule wird ohne zusätzliche Pumpen betrieben. Dabei werden Flußraten zwischen 0,25 bis 2 ml/min erreicht. Nach dem vollständigen Eindringen der Probe wird mit 500 ml Waschpuffer gespült und anschließend mit Elutionspuffer eluiert. Dabei werden Fraktionen von 8 ml (150 Tropfen) in einem Fraktionssammler bei 4°C gesammelt. Verschlechtert sich das Trennvermögen der Säule, wird zur Regeneration mit zwei Litern 1 M NaCl Lösung gespült und mit zwei Litern Waschpuffer erneut equilibriert. Spätestens nach 5 Trennungen wird standardmäßig regeneriert.

2.4.1.2 Affinitätschromatographie: Dye-Ligand Red-A (synthetische Farbstoffliganden auf Agarose Matrix)

Grundlagen

Bei der Farbstoff-Liganden-Chromatographie handelt es sich im Prinzip um eine strukturspezifische Art der Ionenaustauscherchromatographie. Dabei werden Liganden verwendet, die entweder spezifisch aufgrund ihrer Struktur und den damit verbundenen Wechselwirkungen oder unspezifisch, d.h. allein aufgrund ihrer Ladung an Proteine binden.

Bei dem verwendeten Material handelt es sich um ein relativ großes dimeres Farbstoffmolekül mit hoher Spezifität zu NADP-bindenden Proteinen [99].

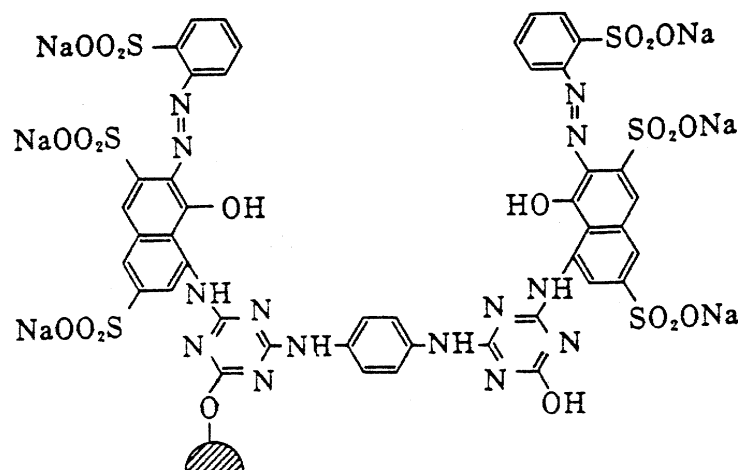


Abbildung 2-1 Struktur des Red-A-Ligandenmolekül. Bei der Dissoziation der Na-Atome entstehen freie Sulfonyl-Anionen

Materialien

kühlbare Säule: Höhe: 20 cm; Durchmesser: 2 cm; Volumen: 60 ml

Peristaltik Pumpe: *Pharmacia* P-1

UV/Vis-Spektrometer: *Perkin Elmer*: Lambda 2

Säulenmaterial: Dey Ligand Red-A, Fa. *Amicon* (Freiburg)

Lösungen

Waschpuffer: 20mM $K_xH_{3-x}PO_4$, pH: 7,0; Elutionspuffer = Waschpuffer + 1,5 M NaCl

Packen der Säule

10 g trocknes Säulenmaterial wird unter langsamem Rühren in 100 ml dest. Wasser gelöst. Die nach einer Stunde erhaltene homogene Suspension wird in eine bei +4°C gekühlte Säule gefüllt. Nach dem Absetzen des Säulenmaterials werden die leichten nicht abgesetzten Bestandteile (Fines) abgesaugt und anschließend wird der untere Abfluß der Säule geöffnet. Vor dem Auftragen der Probe wird die Säule 12 Stunden mit Waschpuffer bei 0,1 ml/min equilibriert.

Betrieb der Säule

Die Säule wird mit einer Peristaltikpumpe bei 0,5 bis 2 ml/min betrieben. Verschlechtert sich das Trennvermögen der Säule, wird zur Regeneration mit 100 ml 6 M Harnstoff, 0,5M NaOH Lösung gespült und anschließend mit Puffer equilibriert, bis der Durchlauf neutral ist. Spätestens nach 5 Trennungen wird standardmäßig regeneriert.

Sollte die Säule längere Zeit nicht betrieben werden, wird zur Konservierung mit 0,04 % NaN_3 in Waschpuffer gespült. Vor erneutem Betrieb wird die Säule regeneriert.

2.4.1.3 Affinitätschromatographie: Sepharose (Fast Flow) mit gekoppeltem Antikörper

Materialien

kühlbare Säule: Höhe: 10 cm; Durchmesser: 1 cm

UV/Vis-Spektrometer: *Perkin Elmer*: Lambda 2

Peristaltik-Pumpe P1 Pharmacia Biosystems:

Antikörper gekoppelte Sepharose (siehe Kapitel 2.9.2.2)

Lösungen

Waschpuffer: 0,1 M Glycin, pH: 8,0; 0,5 M NaCl; 0,04% NaN₃

Elutionspuffer: 0,1 M NaOAc, pH: 4,5; 0,5 M NaCl; 0,04% NaN₃

Regenerationspuffer: 0,1 M Glycin, pH: 2,7; 0,5 M NaCl; 0,04% NaN₃

Packen der Säule

Etwa 5-10 ml der Sepharose-Suspension wird in eine bei +4°C gekühlte Säule gefüllt. Nach dem Absetzen des Säulenmaterials werden die leichten, nicht abgesetzten Bestandteile (Fines) abgesaugt. Vor dem Auftragen der Probe wird die Säule 12 Stunden mit Waschpuffer bei 0,1 ml/min equilibriert.

Betrieb der Säule

Die Säule wird mit einer Peristaltikpumpe betrieben. Dabei werden Flußraten zwischen 1 und 2 ml/min erreicht. Vor den Auftragen der Probe wird diese gegen Waschpuffer dialysiert. Dabei ist mindestes mit einem Verhältnis Dialyse-Lösung/Protein-Lösung von 10/1 zu arbeiten. Nach einer Kontrolle des pH-Wertes der Proteinlösung kann auf die Säule aufgetragen werden. Anschließend wird mit ca. 0,5 Litern Waschpuffer gewaschen und mit 0,5 Litern Elutionspuffer eluiert. Dabei werden Fraktionen von je 5 ml in einem Fraktionssammler bei 4°C gesammelt. Verschlechtert sich das Trennvermögen der Säule, wird zur Regeneration mit 0,5 Litern Regenerationspuffer gespült und mit 0,5 Litern Waschpuffer equilibriert. Spätestens nach 5 Trennungen wird standardmäßig regeneriert.

2.4.1.4 Affinitätschromatographie: Protein-A Sepharose

Grundlage

Bei dem Protein-A handelt es sich um ein membranständiges Protein von *Staphylococcus aureus*. Das 42 kD große Molekül besitzt insgesamt 6 Bindungsstellen für Immunglobuline. Fünf dieser Bindungsstellen erkennen mit sehr hoher Affinität die Fc-Region des IgG. Es werden beinahe alle Immunglobuline verschiedener Säugetierspezies mit unterschiedlicher Affinität gebunden [100].

Materialien

FPLC-Anlage: Pharmacia Biosystems

- 2x Pumpe P 500
- Gradient Programmer GP 250
- Single path monitor UV 1, 280 nm
- Fraction collector FRAC 100

Peristaltikpumpe P1 Pharmacia Biosystems

Lösungen

Waschpuffer: 0,1 M Tris, pH: 9,0 ; 2 M NaCl

Elutionspuffer: 0,1 M Citrat, pH: 3,0

Packen der Säule

5 ml der käuflich zu erwerbenden Protein-A-Sepharose Suspension werden langsam bei +4°C in einen Pharmacia -Säulenkörper gegeben. Von unten zieht dazu eine Peristaltikpumpe mit ca. 0,5 ml/min. Nach dem vollständigen Auftragen der Suspension wird mit mindestens 10 ml Waschpuffer gespült. Danach wird der Säulenkörper geschlossen und in die FPLC-Anlage eingebaut.

Betrieb der Säule

Die Säule wird an einer FPLC-Anlage betrieben. Zur Equilibrierung wird mindestens 1 Stunde bei 0,5 ml/min mit Waschpuffer gespült. Nach dem Auftragen der Probe in eine 2 ml Probenschleife, wird mit 10 ml Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 10 ml Elutionspuffer eluiert. Der Durchlauf wird in einer optische Einheit direkt bei 280 nm vermessen. Die erhaltenen Fraktionen werden in einem Fraktionsammler gesammelt.

Verschlechtert sich das Trennvermögen der Säule, wird zur Regeneration das vom Hersteller empfohlene Verfahren angewendet: Zuerst mit 10 ml 1N NaCl unspezifisch gebundenes Protein eluieren, dann mit 10 ml 1N Propionsäure und wieder mit 10 ml 1N NaCl bei einer Flußrate von 0,1 ml/min spülen.

Sollte die Säule längere Zeit nicht betrieben werden, wird zur Konservierung mit 0,04% NaN_3 in Wasser gespült.

2.4.1.5 Kationenaustauscher: Resource S (Sulfopropyl)

Materialien

FPLC-Anlage: s.o.

Säule: Resource S, 1 ml, *Pharmacia*

Lösungen

Waschpuffer: 20mM NaOAc, pH: 4,5; Elutionspuffer = Waschpuffer + 0,5 M NaCl

Betrieb der Säule

Die Säule wird an einer FPLC-Anlage betrieben. Dabei wurde mit verschiedenen Flußraten, Puffern und Gradienten experimentiert. Am effektivsten war die Reinigung bei pH 4,5, wobei mit einem Salzgradienten von 0-0,5 M NaCl bei 2 ml/min eluiert wurde. Der Säulendurchlauf wird in einer optische Einheit direkt bei 280 nm vermessen. Die Fraktionen werden in einem Fraktionsammler gesammelt.

Verschlechtert sich das Trennvermögen der Säule, wird zur Regeneration das vom Hersteller

empfohlene Verfahren angewendet: Zuerst wird 10 ml 1N NaCl und anschließend mit 10 ml 1N NaOH gewaschen. Sofort wird mit 10 ml 1N HCl angesäuert und mit 10 ml Waschpuffer wieder equilibriert. Die Flußrate beträgt dabei 1 ml/min.

Sollte die Säule längere Zeit nicht betrieben werden, wird zur Konservierung mit 20 % Ethanol-Lösung gespült. Vor erneutem Betrieb wird die Säule regeneriert.

2.4.1.6 Anionenaustauscher: DEAE (Diethylaminoethyl)

Materialien

FPLC-Anlage: s.o.

Säule: BioSep DEAE, 75 x 7,5 mm, *Phenomenex*

Lösungen

Waschpuffer: 20mM NaH₂PO₄, pH: 8,0; Elutionspuffer: Waschpuffer + 0,5 M NaCl

Betrieb der Säule

Die Säule wird an einer FPLC-Anlage betrieben. Dabei wurde mit verschiedenen Flußraten, Puffern und Gradienten experimentiert. Die beste Trennleistung wurde bei pH 8,0 erreicht, wobei mit einem linearen Salzgradienten von 0-0,5 M NaCl bei 2 ml/min eluiert wurde. Der Säulendurchlauf wird mit Hilfe einer optischen Einheit direkt bei 280 nm vermessen. Die Fraktionen werden in einem Fraktionsammler gesammelt.

Verschlechtert sich das Trennvermögen der Säule, wird zur Regeneration das vom Hersteller empfohlene Verfahren angewendet: Zuerst wird 10 ml 1N NaCl und anschließend mit 10 ml 1N NaOH gewaschen. Sofort wird mit 10 ml 1N HCl angesäuert und mit 10 ml Waschpuffer wieder equilibriert. Die Flußrate beträgt dabei 1 ml/min.

Sollte die Säule längere Zeit nicht betrieben werden, wird zur Konservierung mit 20 % Ethanol-Lösung gespült. Vor erneutem Betrieb wird die Säule regeneriert.

2.4.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

2.4.2.1 Größenausschlußchromatographie: Tohaas TSK G4000 sw

Materialien

Säule Toohaas TSK G4000sw 600 x 7,5 mm (LKB)

Vorsäule: Toohaas TSK G4000sw 75 x 7,5 mm (LKB)

Niederdruckgradientenanlage:

Pumpe: Merck/Hitatschi L 6200

Detektor: GAT LCD 501

Injektor: Reodyn

Lösungen

50 mM NaH_2PO_4 , pH: 7,0; 150 mM NaCl

Betrieb der Säule

Die Säule wird an der beschriebenen HPLC-Anlage mit 1 ml/min equilibriert. Es werden sowohl UV-Absorption bei 280 nm gemessen. Injiziert wird in eine 100µl Probenschleife. Dabei wird eine Gesamtproteinmenge von etwa 10 µg/Lauf aufgetragen.

Verschlechtert sich das Trennvermögen der Säule, wird zur Regeneration mit 0,1 Litern 0,5% SDS in Laufpuffer gespült und mit 0,5 Litern Laufpuffer equilibriert.

Sollte die Säule längere Zeit nicht betrieben werden, wird zur Konservierung mit 0,04 % NaN_3 -Lösung gespült.

2.4.2.2 Umkehrphasenchromatographie: Phenomenex Jupiter C-5

Materialien

Säule: Phenomenex Jupiter 250x0,45mm, C-5, 300A, 5μ

Vorsäule: Phenomenex Security Guard Column

Hochdruckgradientenanlage (s.o.)

Lösungen

Laufpuffer A: 0,1 % TFA in Wasser

Laufpuffer B: 0,1 % TFA in Acetonitril

Betrieb der Säule

Die Säule wurde an der beschriebenen HPLC-Anlage mit 0,5 ml/min Laufpuffer A equilibriert. Es wird sowohl UV-Absorption bei 214 nm, als auch Fluoreszenz bei 280/340 nm gemessen. Injiziert wird in eine 200μl Probenschleife. Es wird durch einen linearen Gradienten von 20-60% Puffer B in 120 Minuten eluiert.

Verschlechtert sich das Trennvermögen der Säule, wird die Vorsäule ausgetauscht (nach etwa 10 Injektionen).

Sollte die Säule längere Zeit nicht betrieben werden, wird zur Konservierung mit 100% Methanol gespült.

2.5 Elektrophoretische Methoden

2.5.1 SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese) nach Lammeli

Grundlagen

Bei allen Arten von Gelelektrophoresen handelt es sich um eine einfache und relativ schnelle Methode, Makromoleküle auf Grund ihres Wanderungsverhaltens im elektrischen Feld zu trennen. Dabei spielen sowohl Ladung als auch Dielektrizitätskonstante, Größe und Masse der Moleküle eine Rolle.

Zur Fixierung der zu trennenden Moleküle wird bei dieser Methode ein 10 %iges Polyacrylamid-Gel verwendet, welches durch gezieltes Vernetzen mit N,N'-Methylenbisacrylamid hergestellt wird. Das langsam polymerisierende Gemisch wird dabei zwischen zwei 10 x 7 cm große Glasplatten gefüllt, so daß nach dem Aushärten ein 0,5 cm dickes Gel entsteht.

Bei der chemischen Reaktion handelt es sich um eine einfache Polymerisierung. Reaktionsstarter sind Radikale, welche durch den chemischen Zerfall von Ammoniumpersulfat $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ entstehen. Das zugesetzte TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) hat die Aufgabe, die freien Radikale zu stabilisieren.

Die Besonderheit der SDS-PAGE besteht zum einen in der Verwendung von zwei Gelschichten unterschiedlicher Zusammensetzung, zum anderen in der Zugabe von SDS zu allen verwendeten Lösungen. Durch das nahezu vollständige Denaturieren aller Proteine und die Assoziierung mit sehr vielen negativ geladenen SDS-Molekülen wandern die Proteine nun ausschließlich aufgrund ihrer Größe und nicht länger aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung durch das Gel. Die „Eigenladung“ der Proteine ist somit zu vernachlässigen.

Die Probe muß nun zunächst durch das Sammelgel wandern, bevor sie dann im Trenngel weiter aufgetrennt wird. Das Sammelgel hat deutlich größere Porendurchmesser als das Trenngel und ist zudem saurer. So wandern die Proteine relativ schnell durch das Sammelgel, um dann an der Grenzschicht auf ein dichteres Material mit höherem pH-Wert auf zu treffen. Dabei wandern die Puffer-Ionen aus dem oberen Reservoir in das Sammelgel, während die Glycin-Puffer-Ionen des Sammelgels vorauslaufen. Beim Eintritt in das Sammelgel werden die Puffer-Ionen des oberen

Reservoirs einem pH-Wert ausgesetzt, der deutlich unter ihrem pH-Wert liegt. Sie nehmen deshalb ihre ungeladene Form ein, was sie elektrophoretisch gesehen zum Stillstand bringt. Dies verursacht einen Mangel an Ladungsträgern und somit einen hohen elektrischen Widerstand. Nach dem Ohmschen Gesetz hat dies einen lokalen Anstieg der Feldstärke zur Folge. Angetrieben durch die erhöhte Feldstärke wandern nun die geladenen Proteine durch das Sammelgel, um an der Grenzschicht zum Trenngel abgebremst zu werden, da hier kein Ionen-Mangel mehr herrscht. Auf diese Weise werden alle aufgetragenen Proteine zu einer schmalen Bande vereinigt, bevor sie im Trenngel aufgetrennt werden [101].

Lösungen

- 40% Acrylamid / Bisacrylamid 37,5:1
- Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl, 0,4 % SDS, pH: 8,8
- Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl, 0,4 % SDS, pH: 6,8
- Elektrophoresepuffer: 20mM Tris, 100mM Glycin, 0,1% SDS, pH: 8,3
- AP 10% (Ammoniumpersulfatlösung)
- AP 2,1 g/l
- Proben-Puffer: 20% Glycerin, 10% Mercaptoethanol , 4% SDS, 125 mM Tris, pH: 6,8, 0,025% Bromphenolblau

Materialien

Elektrophoresekammer - BIO RAD Mini Protean II

Durchführung

1. Zusammenbau der Gelformen

Die Anleitung bezieht sich auf die Elektrophoreseapparatur Miniprotean II der Firma BIO-RAD.

In einem dafür vorgesehenen Ständer werden zunächst zwei unterschiedlich hohe Glasscheiben in einen Rahmen eingeführt. Zwischen die Scheiben werden an beiden Seiten jeweils 0,5 mm

dicke Plastikstreifen (Spacer) gebracht. Die Scheiben werden mit Schrauben so in dem Rahmen eingepaßt, daß sie an ihrer Unterseite möglichst eben mit den Spacern abschließen. Zwei so vorbereitete Rahmen werden in einer Elektrophoreseapparatur befestigt.

2. Gießen der Gele

Pro Gel werden 3,6 ml Trenngellösung und ca. 1 ml Sammelgellösung benötigt. Die Lösungen werden nach folgenden Pipettierschema jeweils unmittelbar vor der Anwendung hergestellt:

Tabelle 2-1 Pipettierschema für 2 Gele

Lösungen	Trenngel 10%	Sammelgel 5%
Wasser	4 ml	0,5 ml
Acrylamid 40%	2 ml	0,5 ml
TG-Puffer	2 ml	-
SG-Puffer	-	1 ml
10% AP	25 µl	-
AP 2,1 mg/ml	-	2 ml
TEMED	5 µl	5 µl

Zunächst werden 3,6
ml Trenngellösung

vorsichtig mit Hilfe einer Pipette zwischen die Glasscheiben gegossen und mit wenig Wasser überschichtet. Man läßt das Gel ca. 30 Minuten polymerisieren. Dabei ist darauf zu achten, daß die Apparatur eben steht, um eine gerade Gelform zu gewährleisten.

Nach dem Aushärten wird das überstehende Wasser abgesaugt. Nun wird etwa 1ml Sammelgellösung über das Trenngel gegeben und mit einen 10-zahnigen Probenkamm nach oben verschlossen. Das Sammelgel ist nach etwa 5 Minuten ausgehärtet.

3. Beladen der Gele

Nach dem Entfernen der Probenkämme werden die zwei Gele in einen Elektrophoreserahmen eingespannt. Zwischen die Gele füllt man Elektrophoresepuffer und kann dann mit dem Beladen der Gele beginnen. Dabei sollten, je nach anschließendem Färbeverfahren, 1 bis 10 µg Protein pro Probenkammer aufgetragen werden. Handelt es sich um eine Probe mit nur wenigen Proteinen, genügt bereits eine kleinere Menge.

Die zu untersuchenden Proteine sollten schon vor dem Auftragen denaturiert werden. Man mischt dazu die Probe 1:1 mit Probenpuffer und kocht sie 5 Minuten im Wasserbad. Das in dem Puffer enthaltene Mercaptoethanol sorgt für eine Reduktion der Disulfidbrücken, das SDS für ein Entfalten der Proteine.

4. Elektrophorese

Der vorbereitete Rahmen mit den zwei Gelen wird in einem geschlossenen Behälter in Elektrophoresepuffer getaucht (etwa 3 cm vom unteren Rand) und mit der elektrischen Anschlüssen verbunden. Zur Elektrophorese legt man eine konstante Spannung von 200 Volt an. Nach etwa 45 Minuten ist der in dem Probenpuffer enthaltene Farbstoff an das untere Ende des Gels gewandert. Nun beendet man die Elektrophorese und baut die Gele vorsichtig aus ihrem Gestell.

2.5.1.1 Färbeverfahren

Coomassie Brilliant Blue Färbung:

Lösungen:

Färbelösung: 0,1% Coomassie Brilliant Blue G-250; 50% Methanol; 10% Essigsäure

Entfärbelösung: 50% Methanol; 10% Essigsäure

Beim Anfärben mit *Coomassie Brilliant Blue* wird das Gel in einer sauren alkoholischen Farbstofflösung eingelegt. Nach etwa 1 Stunde ist das Gel vollständig durch den Farbstoff gefärbt. Mit Hilfe einer alkoholischen Entfärbelösung wird solange entfärbt, bis das Gel wieder vollständig klar erscheint. Die im Gel enthaltenen Proteine behalten dabei ihre Farbe etwas länger, so daß durch geschicktes Abpassen des richtigen Zeitpunktes sehr gezielt gefärbt werden kann. Nach diesem Vorgang wird das Gel noch kurz in Wasser neutralisiert und anschließend auf feuchtem Filterpapier ausgebreitet und im Vakuum getrocknet.

Der gesamte Färbe- und Entfärbvorgang dauert für Mini-Gele etwa 3 Stunden und führt bei Proteingehalten von 2 bis 10 µg pro Elektrophoresespur zu einem optimalen Ergebnis.

Silberfärbung:

Lösungen:

1. Methanollösung: 50% Methanol
2. Vorbehandlung: 0,4 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
3. Silbernitratlösung: 0,2 % AgNO_3
4. Entwicklerlösung: 0,4 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 2% Na_2CO_3 ; ; 0,07% Formaldehyd 35%
5. EDTA-Lösung: 50 mM Na_2EDTA

Zur Silberfärbung werden die Gele zunächst etwa 1 Stunde in 50 % Methanollösung Lösung 1 gewaschen, um anhaftende Verschmutzungen zu entfernen. Da diese Methode deutlich empfindlicher als die oben beschriebene Coomassie-Färbung ist, sollte schon beim

Zusammenbauen der Gele auf Sauberkeit geachtet werden.

Für 2 min wird mit Lösung 2 vorbehandelt und anschließend 2 mal mit Wasser gewaschen.

Die Imprägnierung mit Lösung 3 findet 10 min im Dunkeln statt. Danach wird erneut dreimal ca. 20 s mit Wasser gewaschen. Zur Visualisierung der Proteine wird anschließend mit Lösung 4 langsam gefärbt. Die auftauchende Schwarzfärbung wird bis zum gewünschten Resultat beobachtet (1-5 min). Durch zweimaliges Waschen mit Wasser und anschließendem Stoppen mit Lösung 5 bleibt die erhaltene Färbung konstant.

2.5.2 Präparative Gelelektrophorese

Die präparative Gelelektrophorese dient zur denaturierenden Reinigung größerer Mengen Protein für die Sequenzanalyse. Hierbei ergeben sich folgende Änderungen im Vergleich zur analytischen Anwendung:

Die Gele sind 1,5 mm dick. Je nach Verfahren kann mit den beschriebenen Probenkämmen, oder ganz ohne Kämme gearbeitet werden. Dabei werden ca. 2cm Sammelgel auf das polymerisierte Trenngel gegossen und vorsichtig mit Isobutanol überschichtet. Nach 5-10 min ist das Gel vollständig ausgehärtet. Das Isobutanol kann nun entfernt werden. Die Probe wird direkt auf das Sammelgel aufgetragen. Da hierbei kein Molekulargewichtsmarker mitgetrennt wird, sollte die zu trennende Probe entweder aus vorherigen Versuchen bekannt sein, oder parallel ein analytisches Gel mit Marker mitlaufen.

Wegen des höheren Stromes während der Trennung wird hierbei 90 min mit 100V getrennt.

Anschließend wurden die Gele wie beschrieben mit Coomassie gefärbt und die einzelnen Proteinbanden mit dem Skalpell ausgeschnitten.

2.5.3 Western Blot

Materialien

Blotkammer BIO RAD

Blot-Folie, entweder Nitrocellulose, oder PVDF

Waters Filterpapier

Lösungen

Blot-Puffer: 10 mM CAPS; 10 % Methanol; pH: 11,0

Durchführung

Es werden 6 Filterpapiere und 1 Nitrocellulose-Folie vorbereitet. Die Größe richtet sich dabei nach dem zu blotenden Gelstück. Für ein ganzes Mini-Gel gilt: 5,5 x 8,2 cm.

Auf einer Blot-Apparatur werden die ersten drei mit Blotpuffer befeuchteten Filterpapiere, die Blot-Folie, das Gel und nochmals drei feuchte Filterpapiere vorsichtig übereinander gelegt. Dabei ist darauf zu achten, daß sich keinerlei Luftblasen mehr zwischen den einzelnen Schichten befindet. Da es sich bei der verwendeten Detektionsmethode um eine äußerst empfindliche Methode handelt, ist bei allen Vorgängen, welche mit dem zu blotenden Gel oder der Blot-Folie durchgeführt werden, auf peinlichste Sauberkeit zu achten und es sind stets saubere, mit dest. Wasser gewaschene Handschuhe zu verwenden. Die so vorbereitete Apparatur wird 30 min bei 2,5 mA /cm² Folienfläche geblottet.

2.5.4 Molmassenbestimmung durch Auswertung der Gelelektrophorese

Trägt man zu jeder Probe einen *Marker* d.h. ein Proteingemisch mit bekannten Proteinen definierter Molmassen auf das Gel, so erhält man nach beendeter Elektrophorese die Möglichkeit eine Kalibrierkurve zu erstellen, die zur Bestimmung des Molekulargewichtes eines unbekannten Proteins verwandt werden kann.

Dazu trägt man das Molekulargewicht der Markerproteine graphisch gegen deren Laufstrecke

auf. Mittels einer logarithmischen Regression erhält man eine Kalibrierkurve, mit deren Hilfe das Molekulargewicht jedes weiteren Proteins auf dem selben Gel bestimmt werden kann.

Tabelle 2-2 Pharmacia Low molekular weigt markerWestern-Blot

Protein	Molmasse [kDa]	Quelle	IEP
<i>Phosphorylase b</i>	94	<i>Hasen Muskel</i>	6,8
<i>Rinderserum Albumin</i>	67	<i>Rinder Serum</i>	5,6
<i>Ovalbumin</i>	43	<i>Eiweiß</i>	5,2
<i>Carbonic Anhydrase</i>	30	<i>Rinder Erythrocyten</i>	7,9
<i>Sojabohnen Trypsin Inhibitor</i>	20,1	<i>Sojabohne</i>	4,7
<i>? -Lactalbumin</i>	14,4	<i>Kuhmilch</i>	4,8

2.5.5 Zweidimensionale Elektrophorese

Materialien

Biorad: IEF Ready-Strips

Lösungen

Rehydration-Puffer: 8 M Urea; 4% CHAPS; 10 mM Dithiotreitol, 0,2% Ampholyt 3/10

Equilibration-Puffer A: 6 M Urea; 20% Glycerin, 2% SDS, 375 mM Tris, pH: 8,8; 2% DTT

Equilibration-Puffer B: 6 M Urea; 20% Glycerin, 2% SDS, 375 mM Tris, pH: 8,8; 2% Iodacetamid

Grundlagen

Bei der 2D-Elektrophorese wird ein Proteingemisch zunächst nach den jeweiligen Isoelektrischen (IEF) Punkten getrennt. Dazu wird ein durch Einpolymerisierung von Puffersubstanzen erzeugter, fester pH-Gradient entlang eines Polyacrylamid-Streifens gebildet.

Die Streifen sind wegen ihrer komplizierten Herstellung in getrockneter Form käuflich erwerbbar.

Baut sich entlang dieses Gelstreifens ein elektrisches Feld auf, so wandert jedes Protein genau so lange in diesem Feld, bis es den pH-Wert seines isoelektrischen Punktes erreicht hat. In einer zweiten Dimension werden die Proteine anschließend in einem „normalen“ SDS-Gel nach ihrer Größe aufgetrennt [102].

Durchführung

Zur Bestimmung des Isoelektrischen Punktes wurde 10 µg hochreines CGBG zunächst bis zur Trockne lyophilisiert und anschließend im entsprechenden Rehydrationspuffer aufgenommen. Diese Lösung gibt man tropfenweise auf den IEF-Gel-Streifen auf, so daß ein Flüssigkeitsfilm auf dem Streifen entsteht. Nach einigen Minuten ist die komplette Flüssigkeitsmenge von dem Streifen aufgesogen worden. Den Vorgang wiederholt man so lange, bis die gesamte Proteinlösung aufgetragen ist.

Der Streifen wird weitere 6 h bei Raumtemperatur rehydriert. Anschließend wird er in einer geschlossenen Apparatur auf 4°C gekühlt und eine Spannung von 250V angelegt. Ist der Strom nach 1 h von 0,4 auf 0,1 mA gesunken, wird die Spannung auf 500V gesteigert. Nach einer Stunde bei 500V sollte der Strom < 0,1 mA sein. Sodann wird bei 1000V für 20 Stunden fokussiert.

Nach erfolgter Fokussierung wird der Gelstreifen für 10 min in Equilibration-Buffer A reduziert und 10 min in Equilibration-Buffer B durch Iodacetamid modifiziert. Anschließend wird der Gelstreifen einer SDS-PAGE unterzogen. Dazu wird der Streifen vorsichtig auf das Sammelgel (ohne Probenkämme) platziert und mit wenigen µl Sammelgel fixiert.

2.6 Protein-Konzentrationsbestimmung

2.6.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Mit Hilfe dieser Methode wird der Proteingehalt mit dem Folin-Ciocalteus Reagens bestimmt

[103]. Bei der Reaktion entsteht ein blauer Farbkomplex, welcher bei 578 nm photometrisch nachgewiesen wird.

Der Farbkomplex setzt sich zusammen aus a) einem Kupfer(II)Komplex mit je vier Stickstoffatomen von Peptidbindungen, b) der Reduktion des Phosphomolybdat-Phosphowolframats (Folin-Ciocalteu-Reagenz).

Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Intensität der Färbung proportional der Konzentration [104]. Als Referenzlösung wird eine handelsübliche Lösung aus Rinderserumalbumin verwendet, die als Referenzprotein international anerkannt ist. Sie liegt in dem käuflich erworbenen Lab-Trol vor. Mit dieser Methode wurden Proteinkonzentrationen bis zu einem unteren Bereich von 0,5 mg/ml bestimmt.

Lösungen

- 10%ige Natriumcarbonatlösung
- 0,1%ige Kupfersulfatlösung
- Folin-Reagens: handelsübliche Lösung 1:3 verdünnt
- Referenzlösung (*Lab-Trol Merz & Dade*) 7 mg/ml

Durchführung:

Tabelle 2-2 Pipettierschema für 7 Proben

Nr.	1	2	3	4	5	6	7
Wasser	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Na ₂ CO ₃	7 ml	7 ml	7 ml	7 ml	7 ml	7 ml	7 ml
CuSO ₄	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Lab-Trol	10 µl	20 µl	30 µl	-	-	-	-
Probe	-	-	-	10 µl	20 µl	30 µl	-
15 min bei RT stehen lassen							
Folin	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
15 min bei RT inkubieren							

Anschließend wurde die Extinktion bei 578 nm bestimmt, wobei Probe 7 als Blindprobe diente. Trägt man die Extinktion der ersten drei Lösungen gegen das zugesetzte Volumen der Proteinlösung auf, erhält man eine Kalibrierkurve mit deren Hilfe die Proteinkonzentration der Probe bestimmen werden kann.

Der Proteingehalt berechnet sich nach:

$$c_p = m_p \cdot c_p / m_s$$

mit:

- c_p = Probenkonzentration
- c_s = Konzentration des Standards
- m_p = Steigung der Probengeraden
- m_s = Steigung der Standardgeraden

2.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Mit Hilfe dieser photometrischen Methode kann der Proteingehalt einer Lösung bestimmt werden [105]. Hierbei kommt der Farbstoff Coomassie Brilliantblau G-250 zum Einsatz

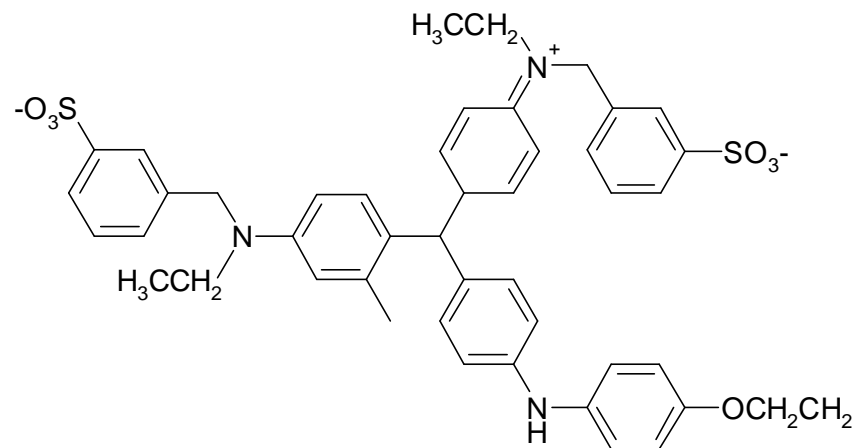


Abbildung 2-2 Coomassie Brilliantblue G-250 als Sulfonat

Im Gegenwart von Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465nm zu 595 nm. Grund dafür ist vermutlich die Stabilisierung des Moleküls in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonat-Form aufgrund der Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein. Das komplette Reaktionsgemisch ist bei *BIO RAD* käuflich zu erwerben.

Als Referenzlösung dient auch hier die oben beschriebene handelsübliche Lab-Trol-Lösung.

Mit dieser Methode wurden Proteinkonzentrationen in einem unteren Bereich von 1 bis 0,1 mg/ml bestimmt.

Lösungen

Bradford-Reagens (Bio-Rad) 1: 5 mit dest Wasser verdünnt

Referenzlösung (*Lab-Trol Baxter*) 7 mg/ml

Durchführung

Sieben Microküvetten wurden wie folgt gefüllt:

Tabelle 2-3 Pipettierschema für 7 Proben

Nr.	1	2	3	4	5	6	7
<i>Bradford-Reagenz</i>	<i>1 ml</i>	<i>1 ml</i>	<i>1 ml</i>	<i>1 ml</i>	<i>1 ml</i>	<i>1 ml</i>	<i>1 ml</i>
<i>Lab-Trol</i>	<i>10 µl</i>	<i>20 µl</i>	<i>30 µl</i>	-	-	-	-
<i>Probe</i>	-	-	-	<i>10 µl</i>	<i>20 µl</i>	<i>30 µl</i>	-

15 min bei RT inkubieren

Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm bestimmt, wobei Probe 7 als Blindprobe diente. Trägt man die Extinktion der ersten drei Lösungen gegen das zugesetzte Volumen der Proteinlösung auf, erhält man eine Kalibrierkurve mit deren Hilfe die Proteinkonzentration der Probe bestimmen werden kann.

Der Proteingehalt berechnet sich nach (s.o.):

$$c_p = m_s * c_s / m_p$$

2.6.3 Proteinbestimmung nach Warburg

Tyrosin und Tryptophan-Reste in Proteinen geben ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Es ist daher nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz möglich, anhand der Extinktion bei 280 nm den Proteingehalt einer klaren Proteinlösung zu bestimmen.

Mit dieser Methode kann auch der Proteingehalt nicht gereinigten Proteiprüben bestimmt werden, sofern man dabei den Gehalt an Nucleinsäuren, welche bei 260 nm absorbieren, berücksichtigt. Die Methode geht davon aus, daß Tyrosin und Tryptophan in allen Proteine etwa zu gleichen Anteilen vorkommen [106].

Warburg und Christian entwickelten so eine Methode, welche die Verunreinigungen durch Nucleinsäuren berücksichtigt [Tabelle 2-4]. Dazu führten sie einen empirisch ermittelten Korrekturfaktor in die Lambert- Beer'sche Gleichung ein:

$$\text{Proteinkonzentration (mg/ml)} = E_{280\text{ nm}} * F / d$$

F = Korrekturfaktor

d = Schichtdicke der zu bestimmenden Lösung

$E_{280\text{ nm}}$ = Extinktion bei 280 nm

Um eine durch relativ hohe Proteinkonzentration zustandekommende Trübung zu korrigieren, wird von allen bei 260 bzw 280 nm gemessenen Extinktionen die Extinktion bei 350 nm abgezogen. Wesentliche Vorteil der Methode ist die sehr schnelle und unkomplizierte Handhabung.

Tabelle 2-4 Tabelle zur Bestimmung des Korrekturfaktors

Verhältnis E_{280} / E_{260}	Anteil Nucleinsäuren	Korrektur Faktor
1,75	0,00	1,116
1,63	0,25	1,081
1,52	0,50	1,054
1,40	0,75	1,023
1,36	1,00	0,994
1,30	1,25	0,970
1,25	1,50	0,944
1,16	2,00	0,899
1,09	2,50	0,852
1,03	3,00	0,814
0,98	3,50	0,776
0,94	4,00	0,743
0,87	5,00	0,682
0,84	5,50	0,656
0,82	6,0	0,632
0,80	6,50	0,607
0,78	7,00	0,585
0,77	7,50	0,565
0,75	8,00	0,545
0,70	10,00	0,478

2.7 Bestimmung der Protein-Herzglycosid Affinität mittels Tryptophan-Quenching

Grundlagen

Beim Vorgang der Lichtabsorption wird die vom Chromophor aufgenommene Energie letztlich in Wärme umgesetzt. Es kann aber auch eine Energieabgabe durch Abgabe von Licht erfolgen. Dieses Phänomen nennt man je nach dem Zeitbereich, in dem die Abgabe erfolgt, Fluoreszenz oder Phosphoreszenz.

Werden Sexualhormone an das gereinigte Sexualbindungsprotein gebunden, so kann man dies anhand der Löschung der Tryphanfluoreszenz nachweisen [91]. Aus der Konzentrationsabhängigkeit der Tryprophanfluoreszenz kann die Dissoziationskonstante des Steroidkomplexes mit dem Bindungsprotein bestimmt werden. Diese Methode wurde auch zur Bestimmung der Wechselwirkung von Herzglykosiden mit dem gereinigten Herzglykosid-Bindungsprotein (CGBG) verwandt.

Durchführung

Die Fluoreszenz des Tryptophan im wurden mit einem Hitachi F-3000 Fluoreszenz-Spektralphotometer bei 37°C im CGBG in einer 1 cm Küvette bestimmt. Spaltbreite des anregenden und ausfallenden Lichts war 5 nm. Durch Aufnahme der Excitations- und Emmissionsspektren bei einer Scangeschwindigkeit von 150 nm wurde eine Anregungswellenlänge von 280 nm und eine Emmissionswellenlänge von 340 nm bestimmt. Dazu wurden 1,0 ml gereinigtes CGBG (0,1 g/L) nach seiner Äquilibrierung mit 0,1 M TBS-Puffer (pH 7,5) durch ein 0,45 µm Filter in die Quarzküvette gegeben. Die Untersuchung der Herzglykosidbindung erfolgte durch die Zugabe von Ouabain im Bereich bis zu 0,5 µM in kleinen Mengen. Das Ausmaß der Fluoreszenzlöschung wurde durch die Verdünnung korrigiert.

Berechnung der Dissoziationskonstante des Ouabain-CGBG-Komplexes

Nach Auftragung der Fluoreszenzlöschung gegen die Herzglykosidkonzentration wurde entsprechend dem Vorschlag von Fortes [107] die maximale Fluoreszenzabnahme (F_{\max}) und daraus die Kapazität des vorgelegten CGBG für das Herzglykosid (C_{\max}) bestimmt. Mit Hilfe dieser Werte konnte nach der Gleichung 1 für jeden einzelnen Meßwert die Konzentration des

freien Herzglykosid und das Verhältnis F/F_{\max} errechnet werden.

Gleichung 1: *Berechnung der Konzentration des freien Ouabain nach Fortes*

$$c_{\text{free}} = c_{\text{gesamt}} - \frac{F}{F_{\max}} * c_{\max}$$

c_{free}	=	Konzentration des freien Ouabains
c_{gesamt}	=	Konzentration des gesamten Ouabains
c_{\max}	=	Maximal gebundenes Ouabains
F	=	Gemessene Fluoreszenz
F_{\max}	=	Maximale Fluoreszenz

Diese neu erhaltenen Meßwerte wurden entweder dazu verwendet, um eine neue Sättigungskurve zu erstellen, oder um eine Auftragung nach Scatchard [108] zu gewinnen. Da die Scatchard-Auftragung zeigte, daß mehr als eine Bindungsstelle am CGBG für Herzglykoside existiert, wurde an die Meßpunkte ein Adair-Pauling Modell zweier interagierender Bindungsstellen angepasst (Gl. 2).

Gleichung 2: *Adair-Pauling Modell eines Proteins mit zwei Bindungsstellen*

$$\left(\frac{F}{F_{\max}} \right) = \frac{\left[\left(\frac{[S]}{K_d} \right) + \left(\frac{[S]^2}{aK_d^2} \right) \right]}{\left(1 + \left(\frac{2[S]}{K_d} \right) + \left(\frac{[S]^2}{aK_d^2} \right) \right)}$$

F	=	gemessene Fluoreszenz
F_{\max}	=	maximale Fluoreszenz
$[S]$	=	Substrat Konzentration (freies Ouabain)
K_d	=	Dissoziationskonstante des Protein-Steroid Komplexes

Die Berechnung der Konzentration des freien Herzglykosids nach Gleichung 1 erfolgte mit dem Computerprogramm Microsoft Excel (Version 8 vom Juni 1997) und die Anpassung der Meßpunkte an die Gleichung 2 mit dem Programm GraphPad-PRISM (Version 3.0 März 1999 for Windows), GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

2.8 Peptidgewinnung und Analyse

2.8.1 Spezifische Spaltung von Proteinen mit Bromcyan

Mit Hilfe von Bromcyan ist eine spezifische Spaltung von Proteine an Methionin Resten möglich. Durch die relativ drastische Reaktionsbedingungen werden zudem die meisten Proteine denaturiert, so daß in Normalfall eine Spaltung an allen Methionin-Resten auftritt [109].

Materialien:

Speed-Vac, Abzug, Wasserbad: 37°C

Lösungen:

70 % Ameisensäure, 1 M CNBr in Acetonitril

Bei der Reaktion wurden die zu spaltenden Proteine vorher im SDS-Gel gereinigt und aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurden über Nacht gut gewässert, um eine möglichst geringe Salzkonzentration zu gewährleisten. Nach dem Wässern wurden die nochmals zerkleinerten Gelstreifen im Speed-Vac völlig getrocknet und in 70% Ameisensäure gequollen.

Die Reaktion wurde im Abzug durch Zugabe von 100 µl Bromcyanlösung pro 10 µg Protein gestartet. Die Reaktion fand im geschlossenen Glas-Probenröhrchen 12 h bei 37°C im Abzug statt..

Nach Beendigung der Reaktion wurden die Produkte im Wasser aufgenommen und 4 Stunden zur Hydrolyse des überschüssigen Bromcyans im Abzug aufbewahrt. Anschließend wurde im Speed-Vac vollkommen getrocknet und erneut in Wasser aufgenommen. Dieses Verfahren wurde solange wiederholt, bis die Lösung nicht mehr sauer war.

2.8.2 Spezifische enzymatische Spaltung mit den Endoproteinasen Trypsin und Lys-C

Bei Trypsin handelt es sich um eine Serin-Endoproteinase, welche aus Rinderpankreas isoliert

wird. Das Enzym spaltet bei pH 7,5-9,0 das Protein spezifisch N-terminal an Lysin und Arginin. Um die Effizienz der Spaltung zu steigern, wurde die Probe vorher mit Harnstoff und Dithiotreitol denaturiert.

Lys-C wird in hochreiner Form aus *Lysobacter enzymogenes* gewonnen. Es spaltet bei pH 7,0-9,0 spezifisch nur N-terminal an Lysin. Wie bei Trypsin wird auch hier die Effizienz der Spaltung durch vorherige Denaturierung mit Harnstoff und Dithiotreitol gesteigert.

Materialien

Speed-Vac, Wasserbad: 80°C, Wasserbad: 37°C

Lösungen

- Tris-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH: 7,5
- 8 M Harnstoff, 0,4M NaHCO₃, pH: 8,5
- 0,1 M Dithiotreitol
- 0,1 M Iodacetamid
- 25 µg Endoproteinase Tockensubstanz in 5 µl Wasser gelöst

1 ml einer 0,1 g/l Proteinlösung in Tris-Puffer wurde der SpeedVac Zentrifuge vollständig getrocknet. Der Rückstand wurde mit 25 µl Harstofflösung gelöst und mit 5 µl 0,1 M Dithiotreitol versetzt. Anschließend wurden 30 min bei 80°C die Disulfidbrücken reduziert.

Sodann wurde die erkaltete Lösung mit 5 µl 0,1M Iodacetamid versetzt und somit modifiziert. Nach weiteren 10 min wurde mit Wasser auf 100µl aufgefüllt. Durch Zugabe von 5 µl frisch angesetzter Trypsin-Lösung wurde die Spaltungsreaktion gestartet. Nach 24h bei 37°C wurden die entstandenen Peptide direkt in die HPLC-Anlage injiziert.

2.8.3 Identifizierung des N-Terminus von Proteinen durch »Edman-Abbau«

Zur Identifizierung der Primärstruktur von Peptiden bedient man sich heute üblicherweise des

»Edman-Abbaus«. Dieses vollautomatisierte Verfahren erlaubt mit relativ geringem Aufwand die Abspaltung und Identifizierung von Aminosäuren vom N-Terminus der Peptide.

Durch Wiederholung dieses Zyklus kann man ganze Sequenzen von bis zu 45 Aminosäuren bei natürlichen und bis zu 80 bei synthetischen Peptiden erhalten. Dabei ist schon mit wenigen Picomolen Peptid eine Analyse möglich [110].

Beim Edman-Abbau reagiert Phenylisothiocyanat (PITC) bei milden alkalischen Bedingungen mit der N-terminalen Aminosäure. Das Produkt wird mit wasserfreier Fluorwasserstoffsäure behandelt, wobei der N-terminale Rest selektiv als Thiazolinol-Derivat abgespalten wird. Die Thiazolinon-Aminosäure wird selektiv mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert und durch Behandlung mit wässriger Säure in das stabilere Phenylthiohydantion-Derivat überführt [111]. Das so erhaltene Produkt kann so mittels HPLC identifiziert werden.

2.9 Immunologische Methoden

2.9.1 Herstellung spezifischer polyklonaler Antikörper

2.9.1.1 Immunisierung von Kaninchen

Jeweils 2 Kaninchen im Alter von 2-3 Monaten und einen Gewicht von 2-3 kg wurden für die Immunisierung verwendet. Alle Versuchstiere waren Weibchen der Rasse «White New Zealand» und wurden von „Charles River GmbH Deutschland“ geliefert.

Noch vor der ersten Immunisierung wurde allen Tieren Blut entnommen. Das daraus gewonnene Serum diente später als Blindprobe.

Die Immunisierung erfolgte durch intrakutane Injektion in den rasierten Rücken. Verwendet wurden dazu 100 µl einer 0,5 mg/ml Proteinlösung. Die Lösung wurde vor der Injektion mit 200µl kompletten Freund's Adjuvans versetzt. Die entstandene Emulsion wurde kräftig geschüttelt (Vortex) und in einer 1 ml Spritze aufgezogen.

Alternativ zu dieser Methode wurde ebenso die Injektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen durchgeführt. Dazu wurden die ausgeschnittenen Gelstreifen gründlich im Wasser gewaschen. Die dadurch stark aufgequollenen Gelstücke wurden mit dem Skalpell in möglichst kleine Stücke geschnitten und durch mehrmaliges Aufziehen in einer 2 ml Spritze weiter zerkleinert. Die gesamte injizierte Proteinmenge entsprach auch hier ca. 50 µg Protein. Die anschließende Injektion erfolgte auch hierbei intrakutan (i.c.) in den Rücken.

Nach der ersten Injektion folgte 2 Wochen später die erste Booster-Injektion mit derselben Substanz. Hierbei wurde die Probe mit 200µl inkompletten Freund's Adjuvans versetzt. Eine Woche später wurde mit der regelmäßigen 2- wöchigen Blutentnahme begonnen.

2.9.1.2 Gewinnung der Globulin-Fraktion aus Kaninchenblut

Zur Blutentnahme wurden die Kaninchen in einem Käfig fixiert und das Fell an der Ohrvene rasiert. Um die Durchblutung der Ohrvene zu verbessern wurde das Ohr mit Xylol bestrichen und die hervortretende Vene mit einem Skalpell durchtrennt. Pro Blutentnahme wurden ca. 30 ml Blut in einem Erlenmeyerkolben gesammelt.

Zur Gerinnung wurde das Blut 3-4 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Anschließend wurde die Probe zur Retraktion des Blutkuchens über Nacht aufbewahrt.

Am folgenden Tag wurde zur Trennung des Serums vom Blutkuchen 15 min. bei 1.000 x g in der Hettich Tischzentrifuge zentrifugiert.. Das so erhaltene Serum wurde vorsichtig abdekantiert und zur Komplementausschaltung 15 min im 56°C Wasserbad inkubiert. Die Globulinfraktion wurde durch 50% Ammoniumsulfat gefällt. Alle Aufarbeitungsschritte erfolgten bei 4°C bzw. im Eisbad. Die Fällung wurde bei 50.000 x g in der Sorval Kühlzentrifuge (Rotor A8.24) abzentrifugiert. Das Sediment wurde in wenig Tris-Puffer (50mM Tris, 150mM NaCl, pH: 7,5) gelöst, und über Nacht gegen denselben Puffer dialysiert.

2.9.1.3 Reinigung der IgG-Fraktion

Die dialysierte Globulinfraktion wurde mit 1M Tris-Lösung auf pH 9,0 eingestellt und bis zu einer Endkonzentration von 2M mit festem NaCl versetzt. Anschließend wurde die Probe durch einen 0,45µm Filter auf eine FPLC-Anlage injiziert und mittels Protein-A-Sepharose getrennt (Kapitel 2.4.1.4). Die erhaltene IgG-Fraktion wurde durch Druckdialyse stark eingeengt und mehrfach mit Tris-Puffer aufgenommen. Die erhaltenen 5 ml Lösung (ca. 2 mg/ml Protein) wurde im Portionen zu je 500µl bei -70°C eingefroren.

2.9.2 Verwendung spezifischer polyklonaler Antikörper

2.9.2.1 Einsatz im Western-Blot

Geräte

Taumler

Lösungen

- TBS: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH: 7,5
- 1% Blockinglösung (1% Casein in TBS)
- 0,5% Blockinglösung (0,5% Casein in TBS)
- TBST: TBS + 0,1% Tween 20
- Färbelösung: DAB: 10 mg Diamminobenzidin in 10 ml TBS + 30 µl 30% H₂O₂
NBT/BCIP: 200 µl NBT/BCIP-Stamm-Lösung (Roche) in 10 ml TBS pH 9,5
- Erster Antikörper: K38 (Antigen zur Immunisierung ist hier das gereinigte CGBG)
- Zweiter Antikörper: Roche Goat-Anti-Rabbit konjugiert mit Peroxidase (POD) oder alkalischer Phosphatase (AP)

Der Western Blot wird wie beschrieben (vergl. Kapitel 2.5.3) durchgeführt. Nach dem Proteintransfer wird die Nitrocellulosemembran 3 mal mit Wasser gespült und sodann 1 h auf einem Taumler mit 1% Blocking-Lösung imprägniert. Dadurch werden alle freien Bindungsstellen auf der Folie vollständig mit Protein belegt. Durch die Inkubation mit dem Anti-CGBG-Kaninchenantikörper (K38) in 0,5% Blockinglösung wird das CGBG spezifisch erkannt. Die üblicherweise verwendete Verdünnung des Antikörpers war 1:1000 (entspricht ca. 2 µg/ml). Die Inkubationszeit beträgt 1 h bei RT, oder 12 h bei 4°C. Anschließend wird der nicht gebundene Antikörper durch 4 mal 15 minütiges Waschen mit TBST entfernt. Der gebundene Antikörper kann nun durch 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit der zweiten Antikörper-Lösung (Anti-Kaninchen) seinerseits spezifisch erkannt werden. Die Verdünnung der zweiten Antikörper-Lösung beträgt hierbei 1:2000 für den POD und 1:5000 für den AP

konjugierten Antikörper.

Ungebundener Antikörper wird erneut durch 4 mal 10 minütiges Waschen mit TBST entfernt. Mit Hilfe der an den zweiten Antikörper konjugierten Enzyme kann der CGBG-Antikörper-Komplex nun angefärbt werden. Je nach verwendetem Enzym kommen dazu DAB-Lösung, bzw. NBT/BCIP zum Einsatz. (Abbildung 2-3, Abbildung 2-4) Die Färbedauer beträgt zwischen 10 s und 10 min.

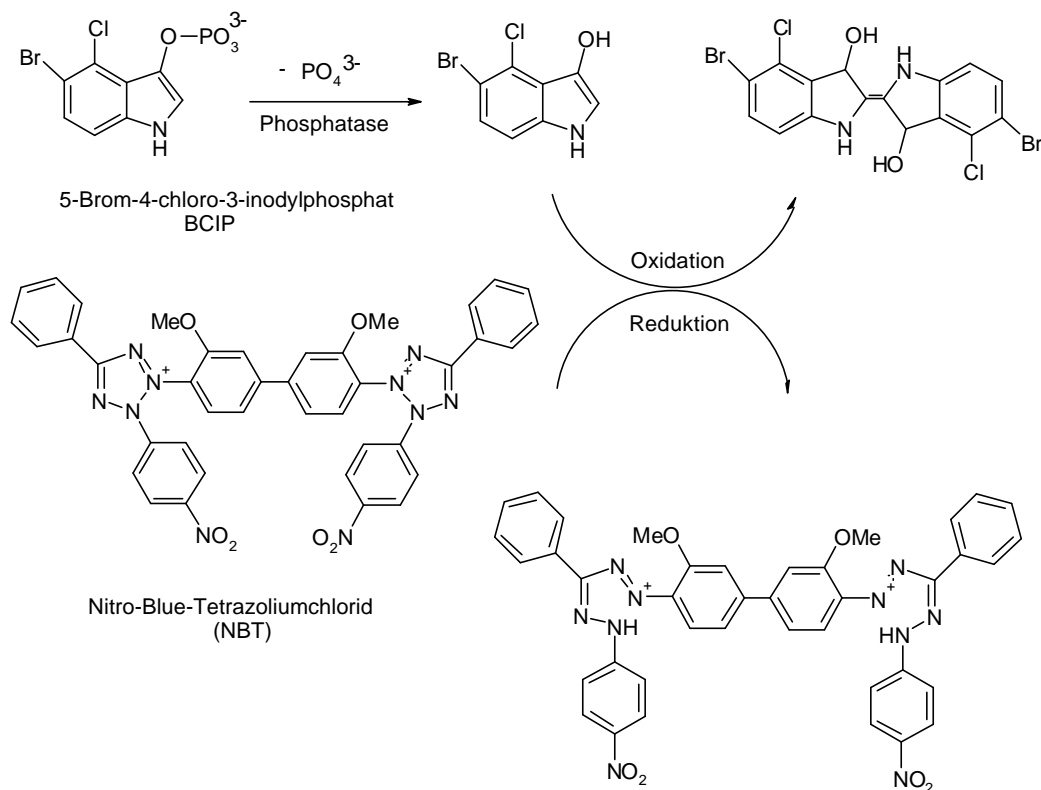


Abbildung 2-3: Reaktionsschema der AP-Färbe-Reaktion

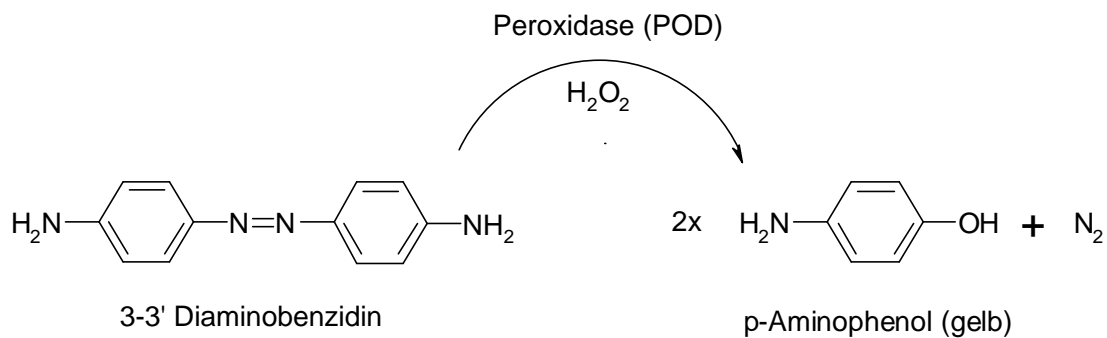


Abbildung 2-4: Reaktionsschema der POD-Färbe-Reaktion

2.9.2.2 Immobilisierung der Antikörper an CNBr aktivierte Sepharose

Materialien:

Mischer: ASID GmbH AUTOMIX1, Glasfritte G3,
CNBr aktivierte Sepharose fast flow (Pharmacia)

Lösungen

Carbonat-Puffer: 50 mM Na₂CO₃, 150 mM NaCl, pH 8,5

Tris-Puffer: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH: 7,5
1,0 mM HCl

Es werden 5g CNBr-aktivierte Sepharose für 12 h bei 4°C in 100ml 1 mM HCl gequollen (das ergibt etwa 25 ml Säulenmaterial). Anschließend wird die Sepharose auf eine G3 Glasnutsche gegeben und die Flüssigkeit vollständig abgesaugt. Sodann wird 5 mal mit 50 ml HCl nachgewaschen, um freies CNBr vollständig zu entfernen. Durch 10 maliges Waschen mit je 10 ml Carbonat-Puffer pH 8,5 wird das Säulenmaterial auf den für die Reaktion nötigen pH-Wert gebracht. Am Ende dieses Waschschrittes sollte die aus der Fritte herauslaufende Lösung einen pH von 8,5 aufweisen und die Sepharose nicht länger schäumen.

Die zu koppelnden Antikörper (10 mg) werden in 10 ml Carbonat-Puffer pH 8,5 aufgenommen und 4 mal für 4 Stunden gegen denselben Puffer dialysiert. Sodann wird von der vorbereiteten Sepharose Suspension vorsichtig der Überstand abdekantiert und die Antikörperlösung zur Koppelung hinzugegeben. Das Gesamtvolumen sollte dabei so klein wie möglich gehalten werden. Die Suspension wird langsam über Kopf gemischt. Nach 4 h wird die überstehende Lösung abgegossen und mehrfach mit Tris-Puffer pH 7,5 gespült, um nicht gekoppelte Antikörper zu entfernen. Das Antikörper kovalent gekoppelt enthaltende Sepharosematerial wurde in eine kühlbare Glassäule gepackt und für 12 h bei 10 °C bei einer Flußgeschwindigkeit von 1 ml/min mit Tris-Puffer gewaschen.

2.9.3 Affinitätsmarkierung mit dem Protein-reaktiven Herzglycosidderivat N-hydroxysuccimidyl-3-o-methylcarbonyl- α -aminocaproat und Detektion der Markierung mittels Digoxin- Antikörper

Prinzip:

Das Prinzip der Affinitätsmarkierung beruht darauf, daß ein Protein (Enzym, Rezeptor, Immunglobulin) zunächst spezifisch und mit hoher Affinität ein proteinreaktives Substratanalog bindet und die Ausbildung des Substratkomplexes durch die Ausbildung einer kovalenten Bindung stabilisiert wird. Der kovalent gebundene Protein-Substratkomplex kann sodann auch nach einer SDS-PAGE noch nachgewiesen werden.

Das Herzglykosidebindungsprotein wurde mit niedrigen Konzentrationen an proteinreaktiven Digoxigenin-derivat HDMA (Abbildung 2-5) inkubiert. Eine Kontrolle mit zusätzlich vorhandenen hohen Konzentrationen an Ouabain wurde mitgeführt. Nach Ausbildung einer kovalenten Bindung konnte der Komplex nach SDS-PAGE und Westernblot mit einem spezifischen Antikörper gegen Digoxin nachgewiesen werden (Abbildung 2-6).

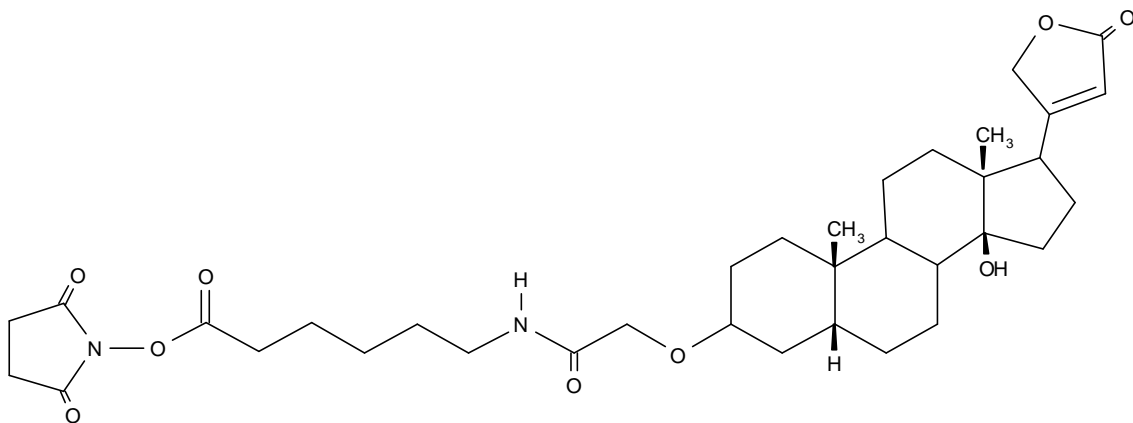


Abbildung 2-5: HDMA (N-hydroxysuccinimidyl-digoxigenin-3-O-methylaminocaproat). Der Succinimid-Rest wird unter Ausbildung einer Säureamisbindung mit einer Aminosäure eines Proteins hydrolytisch abgespalten.

Materialien

Röntgenfilm, Fotoentwickler, Stopplösung und Fixierer (alle: KODAK)

Lösungen:

- TBS: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH: 7,5
- 1% Blockinglösung (1% Protein in TBS)
- Antikörperlösung: 0,5% Blockinglösung + 0,1% *Anti-Digoxigenin-POD Lösung (Roche)*
- TBST: TBS + 0,1% Tween 20
- Substratlösungen für die Chemilumineszenzreaktion (Roche)

Lösung A: Luminol, Lösung B: stabilisiertes H₂O₂

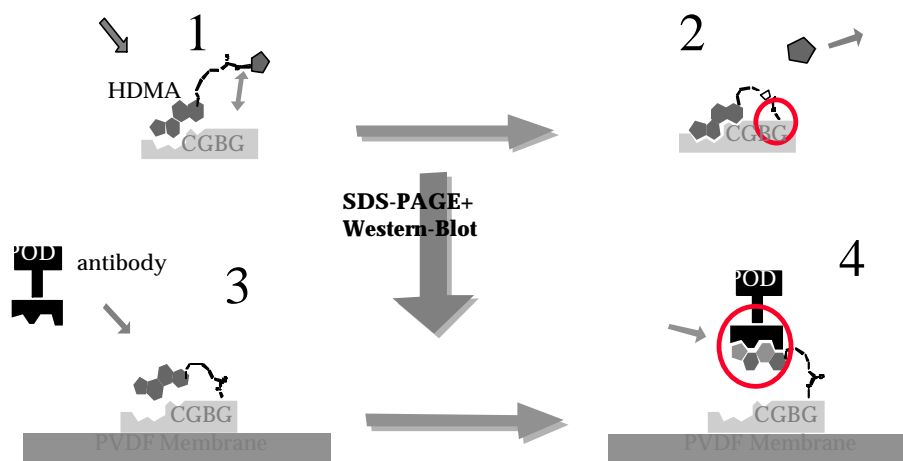


Abbildung 2-6: Affinitätsmarkierung und Nachweis eines Herzglykosidbindungsproteins mit HDMA. (1) Ausbildung eines Substrat-Protein-Komplexes; (2) Stabilisierung des Komplexes durch kovalente Bindung; (3) SDS-PAGE und Western-blot des Protein-CGBG-Komplexes; (4) Nachweis des Komplexes mit einem POD-gekoppelten Digoxin-Antikörper anhand der Luminiszenz. .

Durchführung*HDMA-Markierung:*

Alle zu untersuchenden Proben (5 - 10 µg Protein) werden nach folgendem Schema (Tabelle 2-5) behandelt: Bei pH 7,5 erfolgt eine Inkubation mit 5 nM HDMA, wobei die mitgeführten Kontrollen mit 100 µM Proscillaridin A bzw. Ouabain für 30 Minuten bei 37°C vorbehandelt wurden, um die Herzglykosidbindungsstelle für die anschließende HDMA-Bindung und Ausbildung einer kovalenten Verknüpfung zu blockieren.

Dadurch ist gewährleistet, daß die HDMA-Menge um ein Vielfaches unter der Herzglykosidkonzentration liegt. Bei den eingesetzten Proteinmengen ist noch eine brauchbare Färbung mit Coomassie-Blue zu erzielen. Die Proteinmenge kann jedoch bei Verwendung einer empfindlicheren Färbemethode noch weiter gesenkt werden.

Tabelle 2-5: Pipettierschema für die Affinitätsmarkierung mit HDMA

Ansatz	1	2	3	Konzentration in der Lösung
Tris-Puffer	90 µl	80 µl	80 µl	-
Proben	10 µl	10 µl	10 µl	50 µg Protein
Ouabain; 1 mM	-	10 µl	-	100 µM
Proscillaridin A; 1 mM	-	-	20 µl	100 µM
30 min inkubieren (37°C)				
HDMA; 10 µM	5 µl	5 µl	5 µl	5 nM
30 min inkubieren (37°C)				

Alle Proben werden sodann mit 20 µl Glycerin und 60 µl Proben-Puffer versetzt und für 5 Minuten ins kochende Wasserbad verbracht. Jeweils 30 µl (8 µg Protein) der Proben werden sodann in die Probentaschen eines Polyacrylamidgels für die SDS-PAGE aufgetragen. Die Gele werden 45 min an eine Spannung von 200V angeschlossen. (vergl. Kapitel 2.5.1). Eines der beiden Gele wird mit Coomassie gefärbt, das andere auf Nitrocellulose geblottet.

Chemilumineszenz:

Da das CGBG in den untersuchten Protein-Proben in sehr geringer Konzentration auftrat und weil die Markierung mit dem Herzglycosidderivat ebenfalls in sehr niedriger Konzentration erfolgte, mußte hierbei mit der größtmöglichen Nachweisempfindlichkeit gearbeitet werden.

Durch die Verwendung einer Chemilumineszenz-Methode konnte durch Verlängerung der Reaktionsdauer das gewünschte Resultat erhalten werden (Abbildung 2-7).

Nach dem Western-Blot wird die Nitrocellulosemembran einige Minuten in TBS gewaschen und anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur in 1% Blocking-Lösung und eine weitere Stunde in 0,5% Blocking-Lösung + Anti-Digoxigenin-POD inkubiert. Danach wird je vier mal 15 Minuten mit 50 ml TBST gewaschen.

In der Zwischenzeit werden 3 ml *Substrat A* und 30 µl *Substrat B* auf Raumtemperatur gebracht. Etwa 30 Minuten vor Ende des Waschvorgangs werden beide Lösungen vereinigt. In einer Dunkelkammer wird die NC-Membran eine Minute mit dem Substratgemisch behandelt und anschließend von überschüssigem Substrat befreit. Mit der so behandelten NC-Folie belichtet man einen Röntgenfilm zwischen einer Minute und mehreren Stunden. Die Lichtausbeute steigt dabei in den ersten Minuten stark an und fällt dann langsam wieder ab. Das günstigste Signal/Rausch-Verhältnis erhält man erfahrungsgemäß nach etwa 5 Minuten. Der belichtete Röntgenfilm wird für 5 Minuten entwickelt, abgestoppt und fixiert.

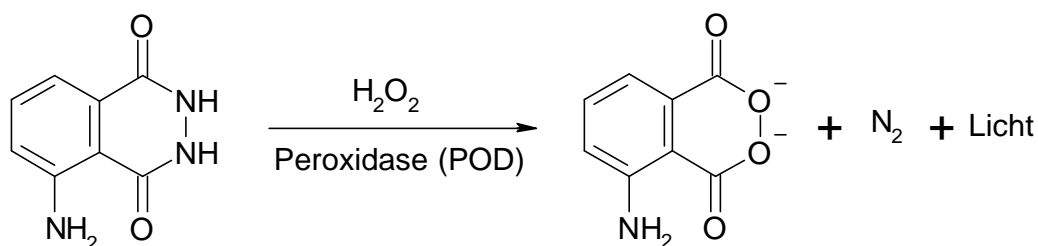


Abbildung 2-7: Reaktionsschema der Chemilumineszenz-Reaktion

3 Resultate

3.1 Proteinreinigung

Die Reinigung des Herzglykosid-Bindungsproteines erfolgte, nachdem die Existenz eines Herzglykosid-Bindungsproteins in ersten Experimenten durch Affinitätsmarkierung nachgewiesen war [112], in zwei verschiedenen Weisen. Dabei war es die vorrangige Aufgabe einer ersten mehr orientierenden Reinigung, Antikörper gegen das Protein zu erhalten. Dieser Weg war erforderlich, da kein quantitativer Test zur Bestimmung der Aktivität des Herzglykosid-Bindungsproteins vorlag. Die mit einer ersten Reinigungsmethode gewonnenen Antikörper wurden für Herstellung einer Antikörpersäule zur Affinitätschromatographie des Herzglykosidebindungsproteins verwendet, sodaß durch die Ausarbeitung einer zweiten Reinigungsmethode die Voraussetzung für die Erhebung von Daten zur Herzglykosidaffinität und den molekularen Eigenschaften des Proteines gewonnen werden konnten.

3.1.1 Orientierende Reinigung des Herzglykosid-Bindungsproteins

Das Ziel dieser Reinigungsmethode war es, das gesuchte Protein soweit zu reinigen, daß im SDS-Gel eine spezifisch markierte Bande zu sehen war. Diese SDS-Gel Bande sollte dann zur Gewinnung von Antikörpern verwendet werden.

3.1.1.1 Fraktionierung von Rinderserum

Vom Schlachthof wurden ca. 10 Liter frisches Rinderblut in einem Plastikeimer geholt und zwei Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Der durch Gerinnung entstandene Blutkuchen wurde vorsichtig vom Eimerrand getrennt, um ihn bei 4°C für weitere 3-4 Stunden noch stärker kontrahieren zu lassen.

Das goldgelbe Serum wurde bei 3.000 x g im Rotor A8-24 der Sorvall RC2B Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert, um restliche Zellen abzutrennen. Der Überstand wurde in einem Becherglas im Eis aufbewahrt und unter Rühren langsam festes Ammoniumsulfat, bis zu einer

Konzentration von 50 % (297 mg/ml) zugegeben. Die entstandene Trübung wurde für 20 min. bei 50.000 x g im Rotor A8-24 der Sorvall RC2B Kühlzentrifuge bei 4°C abzentrifugiert und das Sediment in wenig Glycin-Puffer (siehe. 2.4.1.1) pH 8,0 aufgenommen. Um die Ammoniumsulfatkonzentration in der Probe für die weitere Bearbeitung der Probe zu senken, wurde das gelöste Protein für 12 Stunden bei 4°C gegen das 100-fache Volumen Glycin-Puffer pH 8,0 dialysiert. Der Dialysepuffer wurde dabei 2 mal gewechselt.

3.1.2 Kationenaustauscherchromatographie an CM-Sephadex C 50

Die entsalzte Proteinfraktion aus der vorangegangenen Ammonsulfatfällung (100 ml) wurde auf eine äquilibrierte CM-Sephadex-Säule (50 x 5 cm) aufgetragen und nach Eindringen der Probe mit 2 Litern Glycin-Puffer (pH 8,0) gewaschen. Nach 2-3 Stunden hatten die dunkler gefärbte Bestandteile die Säule passiert. Die an die Säule gebundenen kationischen Proteine wurden sodann mit auf pH 10 eingestelltem Glycin Puffer eluiert und die Absorption des Eluats bei 280 nm bestimmt. Abbildung 3-1 zeigt das erhaltene Elutionsdiagramm und den in den Proben gemessenen pH-Wert. Es wird ersichtlich, daß mit dem Absenken des pH-Wertes zwei voneinander nicht gut getrennte Proteinfraktionen von der CM-Sephadex-Säule eluierten. Die Fraktionen der beiden hintereinanderliegenden Peaks (Peak 1 und Peak 2) wurden gepoolt und sofort auf pH 8,0 eingestellt. Per Druckdialyse wurden beide Fraktionen auf 10% ihres Volumens eingeengt, so daß die anschließende Proteinbestimmung nach Lowry eine Konzentration von 5,5 mg/ml (180 mg insgesamt) für den ersten Peak und 7,4 mg/ml (250 mg insgesamt) für den zweiten Peak ergaben.

Mit den beiden Proben wurden eine Affinitätsmarkierung mit HDMA, eine SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blots angefertigt. Die Tests zeigten, daß sich das gesuchte Protein im Peak 2 befand.

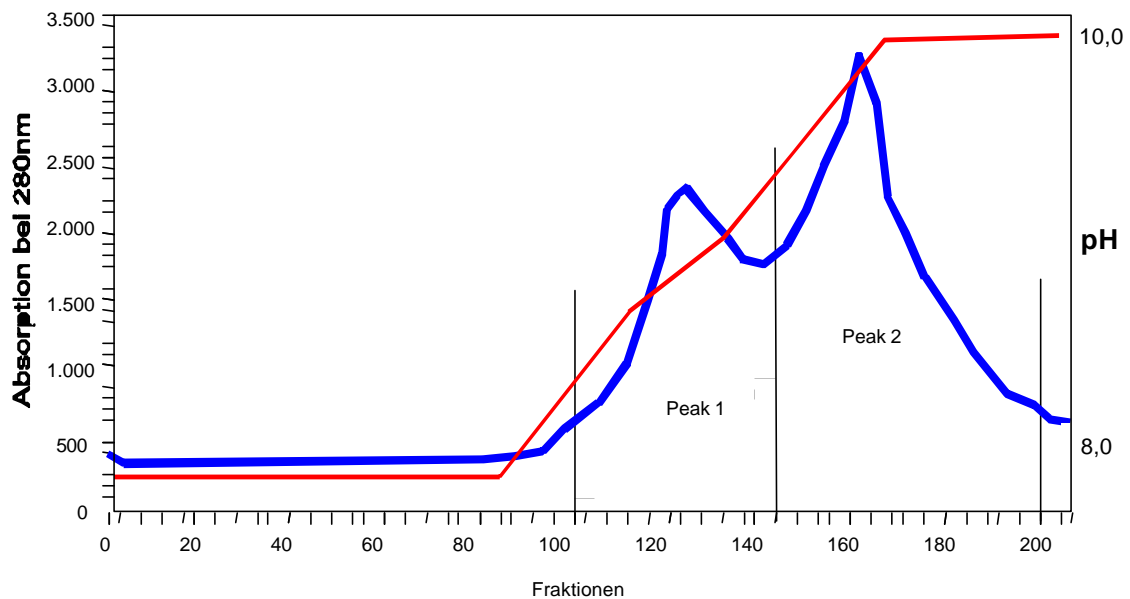


Abbildung 3-1: Trennung der Ammonsulfatfraktion (0-50%) aus Rinderserum an einer CM-Sephadex C 50 Säule. In den Fraktionen wurde die Absorption bei 280 nm und der pH-Wert bestimmt. Der Säulen-Durchlauf ist nicht aufgetragen.

3.1.3 Kationenaustauscherchromatographie an einer Resource-S Säule

Die Fraktionen des 2. Peaks (Abbildung 3-1) wurden an einem Kationenaustauscher (Resource-s) weiter aufgetrennt. Dazu mußte die Probe zunächst 2 x 4 Stunden gegen 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,5 dialysiert werden. Pro Lauf wurden anschließend jeweils 2 ml auf die Resource-S Säule (1 x 0,57 cm) aufgetragen. Nach dem Waschen mit 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 4,5 für 7 Minuten mit einer Flußgeschwindigkeit von 2 ml/min wurde für 10 Minuten ein linearer NaCl-Gradient (0 bis 0,5 M) angelegt, was zur Elution eines Hauptpeaks und von 2 kleineren weiteren Peaks führte.

Zum Nachweis des Herzglykosidbindungsproteins wurden die aufeinander gesammelten Fraktionen von 10 Chromatographie-Läufen durch Druckfiltration eingeeengt. Dabei wurde zweimal mit Tris-Puffer pH 7,5 verdünnt und wieder eingeeengt. Alle Fraktionen wurden 15 min bei 37°C mit 5 nM HDMA inkubiert und als Dot-Blot auf Nitrozellulose-Folie aufgetragen. Die Folie wurde in der beschriebenen Weise mit Antikörpern inkubiert und mittels einer Chemilumineszenz-Reaktion auf einem Röntgenfilm nachgewiesen (Abbildung 3-3).

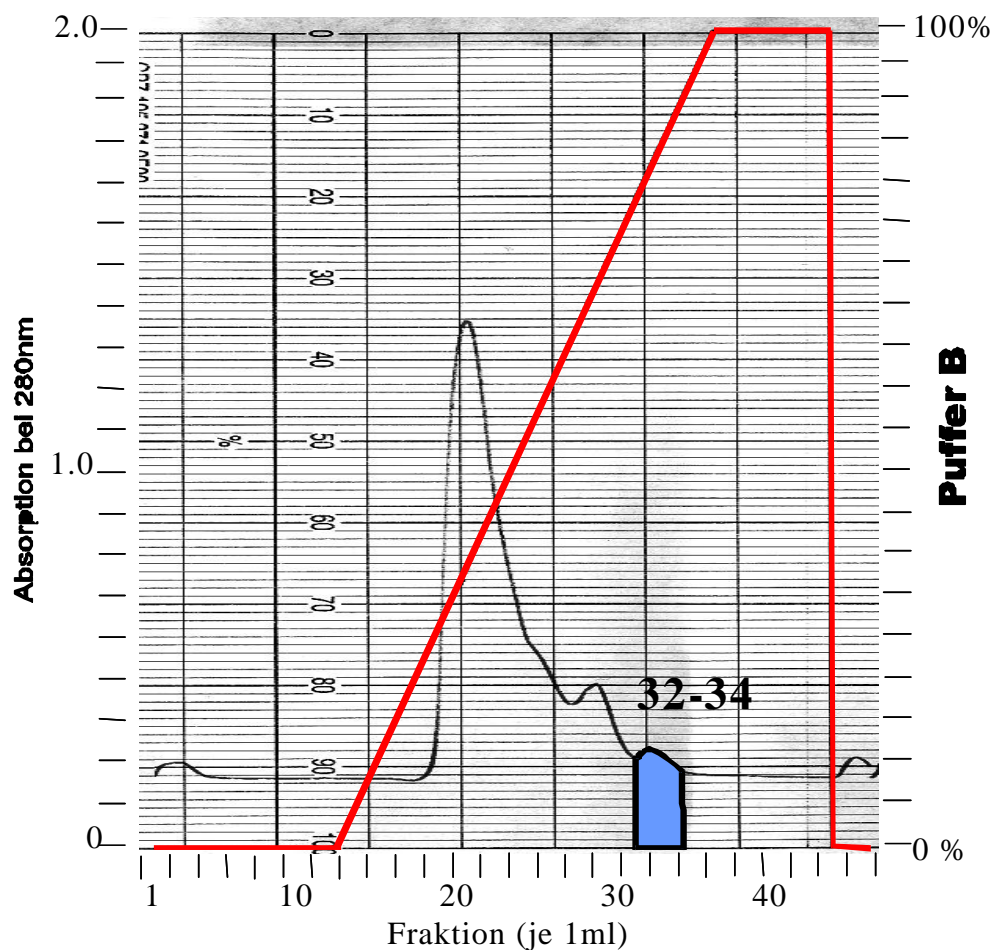


Abbildung 3-2: Kationenaustauscherchromatographie an einer Resource-S Säule bei pH 4,5 in der FPLC. Es wurde ein linearer NaCl-Gradient von 0-0,5M angelegt und die Absorbtion der Fraktionen bei 280 nm gemessen

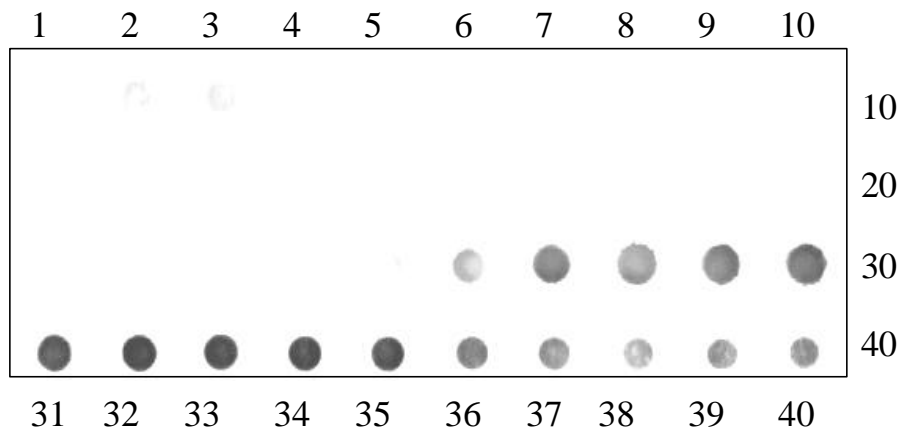


Abbildung 3-3: Dot-Blot der HDMA markierten Fraktionen

3.1.3.1 Farbstoff-Ligandenchromatographie an einer DeyMatrex RED-A Säule

Da Farbstoffligandenchromatographie zugleich eine Affinitätschromatographie und eine hydrophobe Chromatographie ist, schien dieses weitere Prinzip für die weitere Reinigung erfolgsversprechend zu sein. Von den farbigen Sepharose-Matrices Red-A, Blue-A, Blue-B, Green-A und Orange-A band nur das Red-A-Säulenmaterial das Protein und ließ es unter definierten Bedingungen (Kapitel: 2.4.1.2) auch wieder eluieren. Deshalb wurde eine 10 x 2 cm große, kühlbare DeyMatrex Red-A-Säule für die weitere Reinigung des Herzglykosid-Bindungsglobulins (CGBG) verwendet.

Die Dey-Matrex RedA-Säule wurde in einer FPLC-Anlage mit 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 äquilibriert. Die CGBG-haltigen Fraktionen 32-34 aus dem vorangegangenen Trennungsschritt (Abbildung 3-2) wurden mit Hilfe der Amicon-Druckdialyse auf 1/10 des Ausgangsvolumens eingengt und sodann für 12 Stunden gegen 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 dialysiert. Die so weitestgehend entsalzte Probe wurde auf die Red-A-Säule aufgetragen. Nach dem Eindringen der Probe in das Säulenmaterial wurde die Säule für zwei

Stunden bei Raumtemperatur mit dem angegebenen Protein inkubiert, was zu einer besseren Bindung der Proteine an die Säule führte. Anschließend wurde mit 100 ml 20 mM Phosphatpuffer pH 7,0 gewaschen und mit 400 ml eines auf 0,75 Mol/L NaCl in 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 linear ansteigendem Gradienten eluiert. Es wurden 100 Fraktionen von 5 ml gesammelt. Von allen Fraktionen wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt und graphisch gegen die Fraktionsnummer aufgetragen (Abbildung 3-4).

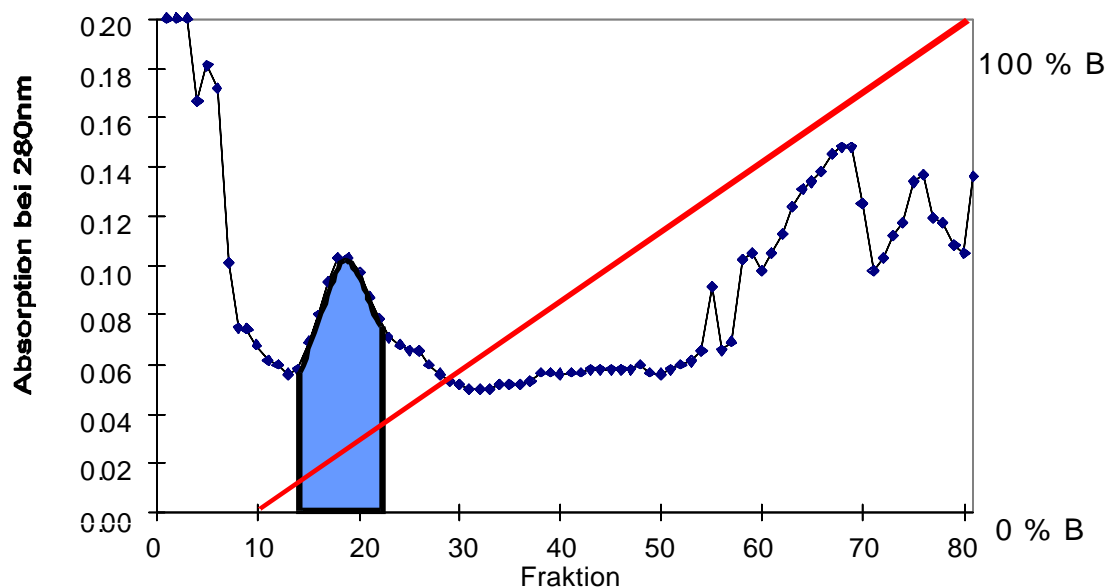


Abbildung 3-4: Farbstoff-Liganden-Chromatographie von CBGB-haltigen Fraktionen an einer Red-A Säule. Die Probe wurde durch einen linearen Gradienten von 0-1,5 M NaCl eluiert. Es wurden Fraktionen zu je 5 ml (100 Tropfen) gesammelt.

Der Fraktionen des ersten Peaks wurde vereinigt und mit Hilfe der Druckfiltration eingeeengt. Die anschließende Proteinbestimmung nach Lowry ergab eine Konzentration von 0,9 mg/ml. (insgesamt 4,5 mg Protein)

Die Auswertung durch SDS-PAGE und Western-Blot mit anschließender immunologischer Detektion zeigte eine relativ reine Proteinfraction. Nun ließ sich zum ersten Mal nur noch eine

Bande durch 5 nM HDMA markieren und durch 100 μ M Ouabain blockieren (Abbildung 3-5). Das spezifisch markierte Protein hatte in der SDS-PAGE eine Masse von 50 kDa.

Eine zusammenfassende Übersicht über die Effektivität der einzelnen Reinigungsschritte zeigt Tabelle 3-1. Aus ihr wird ersichtlich, daß durch die ca. 50.000-fache Reinigung des Herzglykosidbindungsproteins nur sehr geringe Proteinmengen an relativ reinem Herzglykosid-Bindungsprotein gewonnen wurden. Da derzeit kein spezifischer quantitativer Test für die Aktivität des Herzglykosidbindungsproteins zur Verfügung steht, kann keine Aussage darüber getroffen werden, wieviel von dem spezifischen Bindungsprotein während des Reinigungsprozesses seine Aktivität verliert.

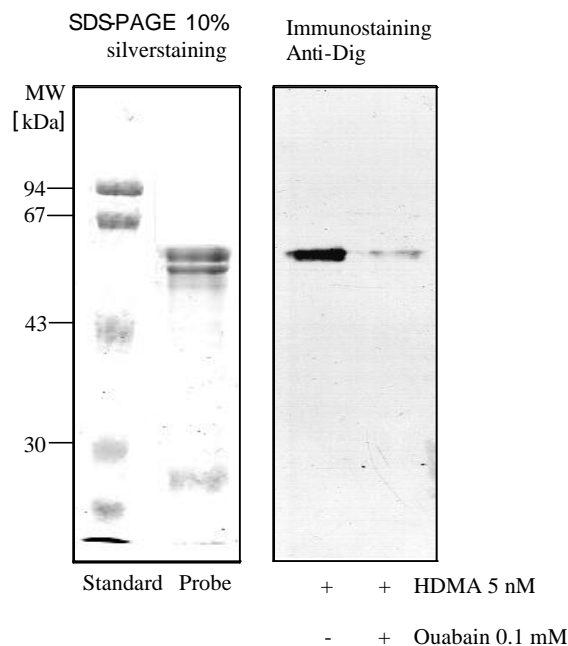


Abbildung 3-5: Affinitätsmarkierung des an einer Red-A-Säule gereinigten Herzglykosidbindungsproteins (Fraktion 14-22) mit HDMA: Links: SDS-PAGE des Red-A-Peaks. Rechts: Western-Blot des Peaks mit immunologischem Nachweis des gebundenen HDMA durch Chemilumineszenz.

Tabelle 3-1: Tabelle der einzelnen Reinigungsschritte (1 Version):

Reinigung	Lösungs- volumen	Proteingehalt [mg/ml]	Proteinmenge [mg]	Reinigung- Faktor *)	Protein- ausbeute
Rinderserum	1630	140	228200	0	100%
(NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung	680	29,8	20264	11	8,88%
CM-Sephadex	34	7,35	249,9	931	0,11%
Resource-S	10	1,2	12	19 016	0,005%
RED-A	5	0,9	4,5	50 711	0,002%

**) Diese Reinigung bezieht sich nur auf das reine Protein. Die Berechnung berücksichtigt nicht, daß die Bindungsaktivität für Herzglykoside aufgrund einer Denaturierung während der Proteinreinigung verloren gehen kann.*

3.2 Chemische und immunologische Charakterisierung des gereinigten Herzglykosidbindungsproteins (1 Version der Reinigung)

Durch die geschilderte Vorgehensweise konnte das gesuchte Protein soweit gereinigt und konzentriert werden, daß im SDS-Gel nun eine einzelne mit HDMA spezifisch markierbare Bande zu sehen war. (Abbildung 3-5). Diese Bande wurde aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und sowohl zur Immunisierung von Kaninchen als auch zur weiteren Charakterisierung des weitgehend gereinigten Proteines verwandt.

3.2.1 Herstellung und Eigenschaften von Kaninchen-Antikörpern gegen das Herzglykosidbindungsprotein

Kaninchen wurden im zwei Wochen Abstand je 50 µl Protein auf 5 SDS-Banden injiziert. Zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurde den Kaninchen Blut aus der Ohrvene entnommen. Die daraus gereinigten Antikörper wurden im Western Blot zu Markierung von Serumfraktionen eingesetzt (vgl. Abbildung 3-5). Als Kontrolle diente das Präimmunserum der

entsprechenden Tiere. Erst nach der 3. Blutentnahmen (ca. 6 Wochen nach der ersten intradermalen Injektion) wurde ein ausreichend hoher Antikörpertiter gesehen. Die Antikörper waren gut dazu geeignet, eine Antikörpersäule für die affinitätschromatographische Reinigung des CGBG herzustellen. Sie waren jedoch - wie später erhobene Resultate zeigten - nicht ausreichend spezifisch, einen quantitativen Test mittels eines kompetitiven ELISA aufzubauen [113].

3.2.2 Proteinchemische Charakterisierung des gereinigten Herzglykosidbindungsproteins:

Die aus der SDS-PAGE ausgeschnittene CGBG-Bande wurde auch dazu verwendet, Information über die N-terminale Aminosäuresequenz zu erhalten. Eine Bestimmung des N-Terminus direkt aus dem SDS-Gel war nicht möglich, also wurde das CGBG auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Bande mit der Molmasse von 50 kDA wurde nach dem Transfer zunächst mit Coomassie gefärbt und dann ausgeschnitten. Die Blotstreifen wurden von Dr. Linder (Institut für Biochemie, Fachbereich Humanmedizin, Universität Gießen) direkt zur Sequenzanalyse eingesetzt. Die daraus erhaltene Sequenz lautete: KDVYRAPDGT.

N-terminale Aminosäuresequenzen sind besonders immunogen. Es war daher zu überprüfen, ob die erhaltene N-terminale Aminosäuresequenz wirklich dem CGBG oder einem anderen Begleitprotein zuzuordnen ist. Daher wurde versucht, polyklonale Antikörper gegen die Aminosäuresequenz KDVYRAPDGT zu erhalten. Da bekannt ist, daß Peptid-Antikörper mit besonders hoher Affinität entstehen, wenn die Merrifield-Synthese von einem an das Harz als Linker verknüpften Polyethylenglykol (POE-Harz) und daran gekoppelten Lysinen in der Form eines Peptidbäumchen ausgeht (siehe Abb. 3-6), wurde diese Technik angewandt.

Obwohl die durch Immunisierung von Kaninchen erhaltenen Antikörper eine sehr hohe Affinität, mit einem K_d -Wert von 1 nM, zu dem Peptid aufwiesen, hat sich leider in sorgfältigen Versuchen mittels ELISA und Western-Blot gezeigt, daß die Antikörper das gereinigte Herzglykosidbindungsprotein nicht erkennen. Das legt den Schluß nahe, daß es sich bei der ermittelten Sequenz nicht um den N-Terminus des Herzglykosidbindungsproteins, sondern den einer begleitenden Verunreinigung handelte. Diese Schlußfolgerung wird auch dadurch unterstützt, daß bei einer Wiederholung der Sequenzanalyse mit einer neuen Präparation des Herzglykosidbindungsproteins die Sequenz KDVYRAPDGT nicht mehr gefunden wurde. Offensichtlich scheint der N-Terminus des Herzglykosid-Bindungsproteins blockiert zu sein. Ferner wurde zur Gewinnung von Peptiden des CGBG ein „In-Gel-Verdau“ mit Endoproteinase

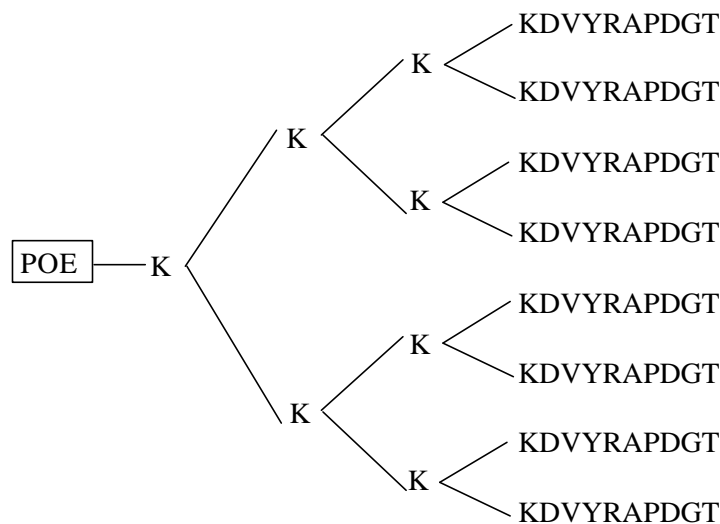


Abbildung 3-6 Immunogenes Polypeptide

Lys-C durchgeführt [110]. Die erhaltenen Peptide wurden mittels reversed-Phase-Chromatographie getrennt (Abb. 3-7). Einige besonders große HPLC-Peaks wurde der automatischen Sequenzanalyse nach Edman zugeführt, welche freundlicherweise von Dr. Linder am Institut für Biochemie des Fachbereiches Humanmedizin der Universität Gießen durchgeführt wurde. Es wurden folgende Aminosäuresequenzen erhalten:

Peptid 20/3 = VSVQXLQXV

Peptid 20/7 = ILVTVHDVF

Die erhaltenen Daten sprechen somit dafür, daß die vorgestellte Reinigungsmethode ausreicht, den Beweis für die Existenz eines Herzglykosidbindungsproteins im Blutserum von Rindern zu führen. Die Reinigungsmethode reicht jedoch nicht aus, Protein in ausreichender Menge und Reinheit für die Gewinnung von Daten zur Molekülstruktur zu erhalten. Um solche Daten und auch Information über die Physiologie des Herzglykosidbindungsproteins erhalten zu können, wurde daher eine weitere und raschere Reinigungsmethode unter Einschluß einer Affinitätschromatographie an Antikörpern gegen das Herzglykosidbindungsprotein ausgearbeitet.

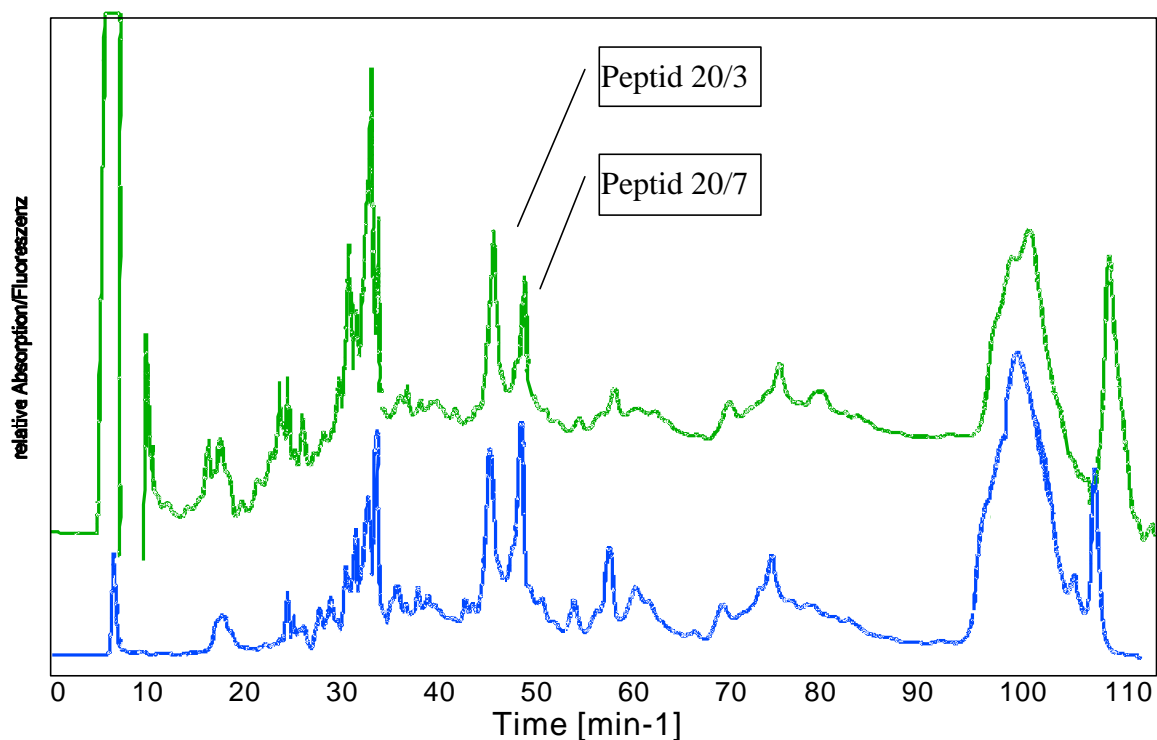


Abbildung 3-6 Chromatogramm der LysC-Peptide aus gereinigtem »CGBG« an einer Jupiter C5-HPLC-Säule (Kapitel 2.4.2.2). Aufgetragen ist 1. die UV-Absorption bei 210 nm (obere Spur), 2. die Tryptophan-Fluoreszenz bei 280/350nm (untere Spur).

3.3 Reinigung des Herzglykosidbindungsproteines (CGBG) unter Einschluß einer Affinitätschromatographie an einer CGBG-Antikörper-Säule

Diese startete mit dem 2. Peak des Eluates aus der Kationenaustauscherchromatographie an CM-Sephadex C 50 (Abbildung 3-1)

3.3.1 Affinitätsreinigung an einer CGBG-Antikörpersäule

Der Peak 2 des Eluates der CM-Sephadex-Säule wurde wie bereits beschrieben auf pH 8,0 gebracht. Anschließend wird die Lösung bei 10°C mit der Geschwindigkeit von 1 ml/min durch eine 5 x 2 cm große Antikörpersäule gepumpt. Vor der Elution wurde mit etwa 200 ml 0,1M Glycin-Puffer 0,5 M NaCl pH 8,0 gewaschen, bis die Extinktion des Durchlaufes bei 280 nm unter 0,02 gesunken war. Die anschließende Elution des Herzglykosidbindungs- globulins mittels eines pH-Sprungs von 8,0 auf 4,5 erfolgte ebenfalls bei einer Flußgeschwindigkeit von 1 ml/min. Die aus der Extinktionsänderung bei 280 nm deutliche sichtbare Fraktion (Abb. 3-8) wurde sofort auf pH 8,0 eingestellt und auf 0°C gekühlt.

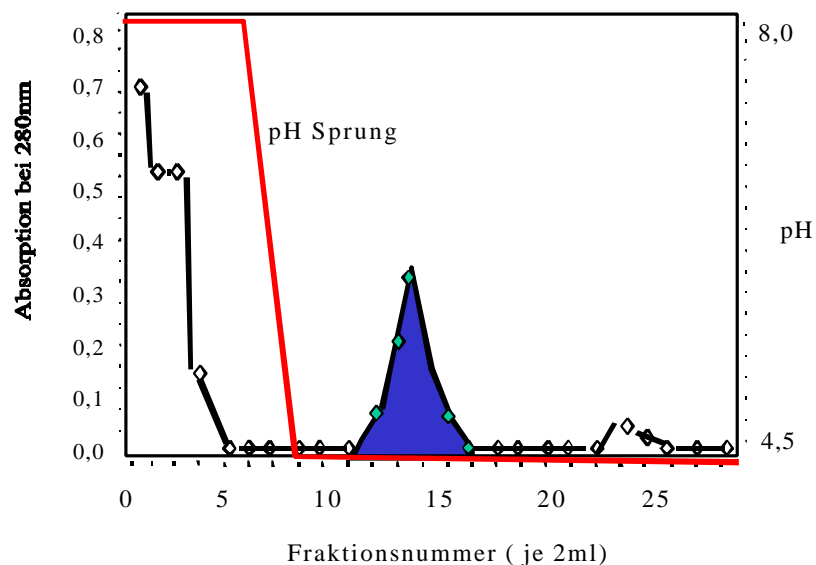


Abbildung 3-7 Elutionsdiagramm der Anti-CGBG-Antikörpersäule. Aufgetragen sind Absorption bei 280nm und pH-Wert des Eluates gegen die Fraktionsnummer

3.3.2 Weitere Reinigung des CGBG an einer DEAE Säule (FPLC)

Das durch Affinitätschromatographie gewonnene Herzglykosidebindungsprotein war noch nicht einheitlich. Daher wurde der CGBG-Peak (Fraktion 12-16, Abbildung 3-7) gesammelt und sofort auf pH 8,0 eingestellt. Die Fraktion wurde für 16 h bei 4°C gegen 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0 dialysiert. Sodann wurde die CGBG-Lösung mit Hilfe einer FPLC-Pumpe durch einen 0,45µ-Filter auf die DEAE-Säule gepumpt. Nach einer weiteren Waschperiode mit mindestens 100 ml des gleichen Puffers wurde mit einem festen Gradientenprogramm eluiert (vergl. Abbildung 3-9).

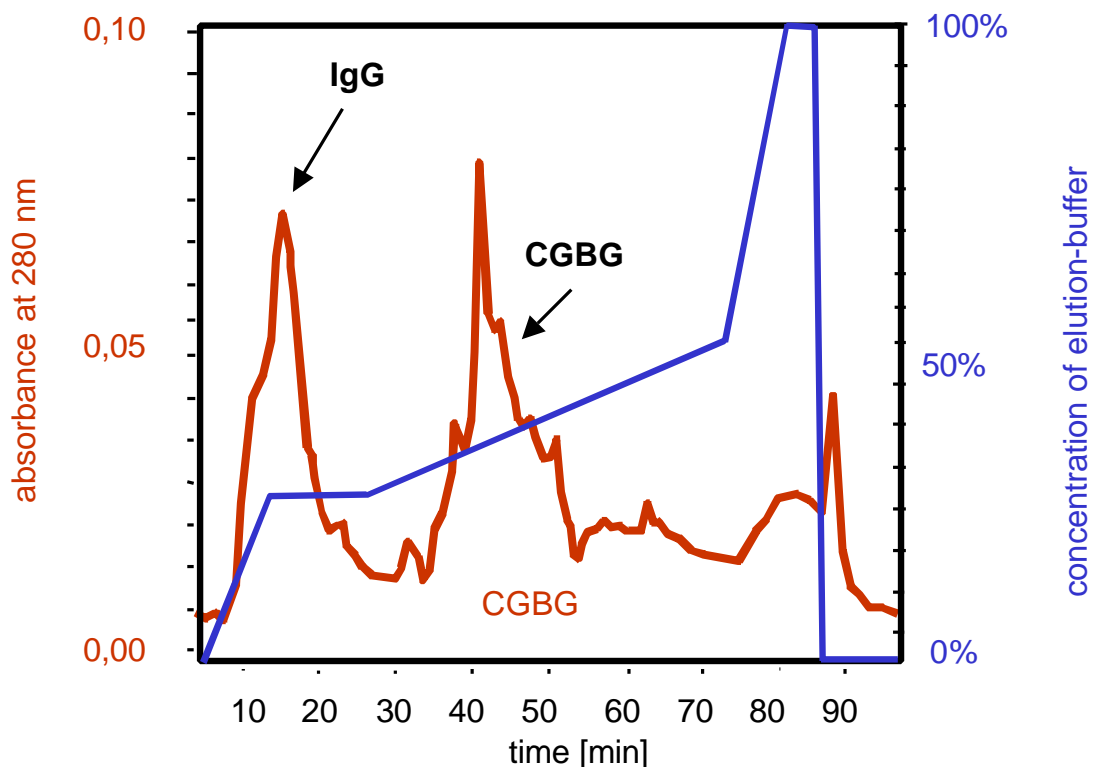


Abbildung 3-9: Trennung von CGBG an einer BIOSEP DEAE-Säule bei pH 8,0. (Kapitel 2.4.1.6). Gradient 0-10min: 0-25%B; 10-25min: 25%B; 25-75min: 25-50%B; 75-85min: 50-100%B; 85-90min: 100%B; 90-91min 100-0%B

Durch die sehr hohe Trennleistung der Säule gelang es weitere Verunreinigungen, die mit von der Affinitätssäule eluiert worden waren, von der Herzglykosidbindungsprotein (CGBG) abzutrennen. .

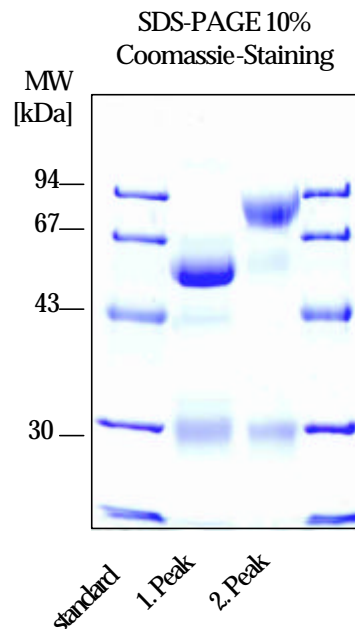


Abbildung 3-10: SDS-PAGE der DEAE-Peaks aus Abbildung 3-9: Peak 1(Fraktion 9-25) zeigt IgG, Peak 2 (Fraktion 34-53) zeigt CGBG

Die Analyse des 1. Peak (Fraktionen von 8-17 Minuten) und des 2. Peak (Fraktionen von 34-53 Minuten (Peak2) mittels SDS-PAGE und Western Blot zeigten, daß unter den gewählten Bedingungen (Abb. 3-8) IgG im Peak 1 eluierte und CGBG-im Peak 2 identifiziert werden konnte (Abbildung 3-10). Obwohl der CGBG-Peak aus mehreren von einander getrennten Peaks besteht, zeigt sich in der SDS-PAGE und der Gelfiltration an der TKS-G4000-Säule doch ein absolut einheitliches Bild (Abbildung 3-12). Die Fraktion, welche zwischen 34-53 Minuten eluierte, wurde deshalb komplett gesammelt und durch Druckdialyse eingengt. In späteren Versuchen (2-D-Elektrophorese: 3.4.2) konnte gezeigt werden, daß das CGBG ein Glycoprotein ist und daß die vermutlich unterschiedliche Glycosylierung des Proteins zur Ausbildung multipler isoelektrischer Punkte führt.

3.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Reinigung durch Affinitätschromatographie (2. Version der Reinigung)

Mit der in der 2. Methode beschriebenen ca 900 000-fachen Reinigung des Herzglykosid-bindungsproteines (Tabelle 3-2) wurde die zunächst 50 000-fache Reinigung der 1. Methode (Tabelle 3-1) wesentlich verbessert. Die Reinigung ist vor allem schneller und braucht nunmehr nur noch 3 Tage anstelle der bisherigen 7 Tage. Am Ende dieser Reinigung steht ein als sauber zu bezeichnendes Protein, das im Gegensatz zur länger dauernden 1. Reinigung ein Protein mit einer höheren Molmasse von 90 kDa ergibt. (Abb. 3-11). Es ist zu vermuten, daß die bei der 1. Reinigung erhaltene Molmasse von 50 kDa (Abb. 3-5) auf proteolytischen Abbau des Proteins mit der Molmasse 90 kDa zurückzuführen ist. Dafür spricht auch der Befund, daß auch mit der weit verbesserten Methodik noch eine geringe Verunreinigung des CGBG mit 30 kDa gefunden wurde (Abb. 3-11). Mit dem in der 2. Reinigungsmethode erhaltenen Protein ist es auch gelungen die Spezifität der gewonnenen Antikörper noch weiter zu steigern. Es konnte zugleich die für die Immunisierung der Kaninchen notwendige Menge auf 10 µg CGBG reduziert werden.

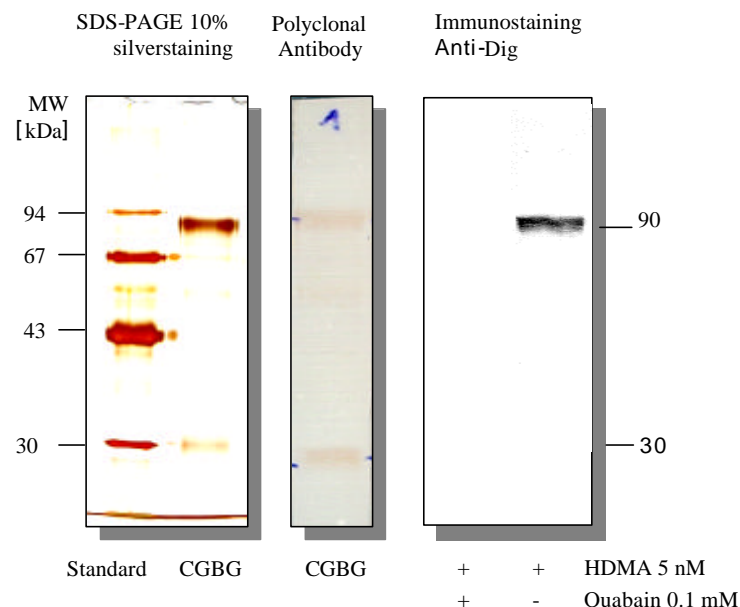


Abbildung 3-11 Links: SDS-PAGE und Silberfärbung von CGBG, Mitte: Western-Blot mit Anti-CGBG, Rechts: Western-Blot mit HDMA-Markierung

Mit Hilfe von Herzglykosidbindungsprotein aus diesem 2. Reinigungsverfahren wurden alle nachfolgend geschilderten Messungen und Untersuchungen angestellt.

Tabelle 3-2 Tabelle der einzelnen Reinigungsschritte (2. Version):

Reinigung	Lösungs- volumen	Proteingehalt [mg/ml]	Proteinmenge [mg]	Reinigungs Faktor*)	Protein- ausbeute
Rinderserum	1630	140	228200	0	100%
(NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung	680	29,8	20264	11	8,88%
CM-Sephadex	34	7,35	249,9	916	0,11%
Antikörpersäule	5	0,1	0,5	456 400	0,0002%
BioSep DEAE	1	0,25	0,25	912 800	0,0001%

**) Diese Reinigung bezieht sich nur auf das reine Protein. Die Berechnung berücksichtigt nicht, daß die Bindungsaktivität für Herzglykoside aufgrund einer Denaturierung während der Proteinreinigung verloren gehen kann.*

3.4 Untersuchung der Proteinstruktur des Herzglykosidbindungsproteins

3.4.1 Untersuchung der Molekülmasse mittels Gelfiltration

Um eine Aussage über die Molekülstruktur des isolierten Herzglykosidbindungsproteins aus Rinderblut zu erhalten, wurde zusätzlich zur bereits benutzten SDS-PAGE auch die molekulare Ausschußchromatographie (Gelfiltration) eingesetzt. Wenn die *LKB TSK G 4000-Säule* mit 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 und 150 mM NaCl betrieben wurde, ergab sich für das untersuchte Protein eine Laufzeit von 15,0 und 21,0 Minuten (Abb. 3-12). Wurde der PBS-Laufpuffer jedoch mit 2 M Harnstoff versetzt und die Probe vor der Chromatographie für 5 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert, so eluierte das Protein ausschließlich mit einer Retentionszeit von 21,0 Minuten. Aufgrund der Kalibrierung der *TSKG 4000 Säule* mit verschiedenen Kalibrier-Proteinen konnten die in Tabelle 3-3 errechneten Molekulargewichte für das native Protein und die entsprechenden Untereinheiten ermittelt werden.

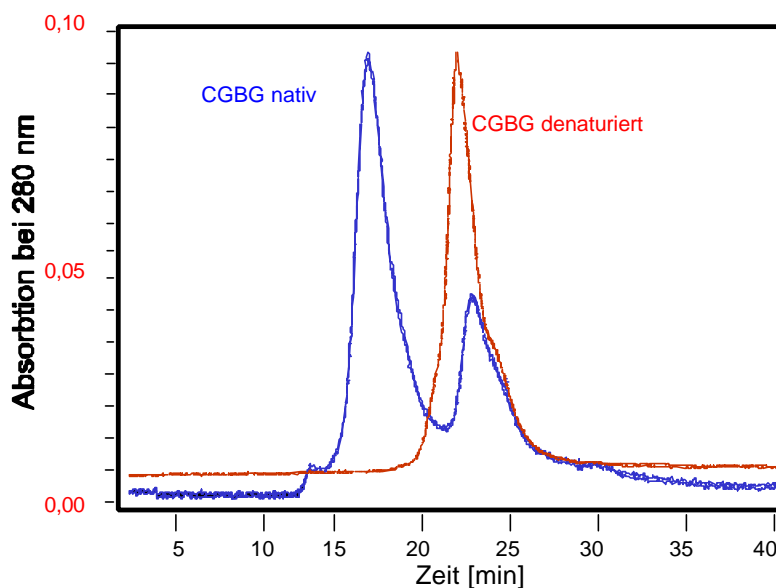


Abbildung 3-12: Chromatogramme der LKB-TSK-G4000-Säule. Blau: natives CGBG; Rot CGBG mit 2M Urea denaturiert (Methode: Kapitel 2.4.2.1).

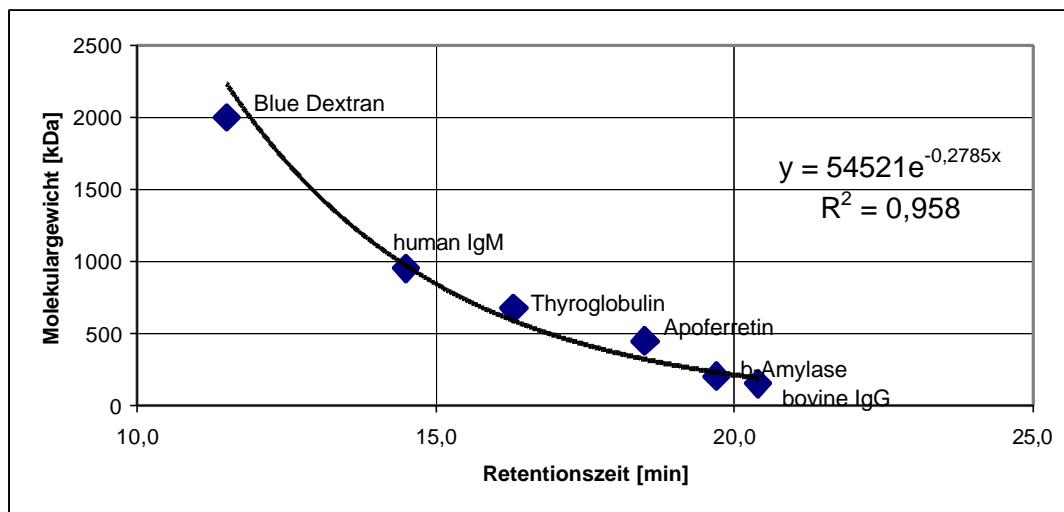


Abbildung 3-13: Kalibrierung der TSK-G4000 Säule mit Protein bekannter Masse

Tabelle 3-3: Auswertung der Größenbestimmung durch Größenausschluß-chromatographie

Protein	Rt [min]	Molmasse	
		Log [kDa]	[kDa]
Blue Dextran	11,5	3,30103	2000
IgM	14,5	2,9777	950
Thyroglobulin	16,3	2,8254	669
Apoferritin	18,5	2,6464	443
b-Amylase	19,7	2,3010	200
IgG	20,4	2,1761	150
CGBG nativ	15,0	2,9249	841
CGBG denaturiert	21,0	2,1971	157

Die errechneten Molmassen betragen für das native Bindungsglobulin 840 ± 60 kDa und für das mit 2 M Urea denaturierte Protein 160 ± 25 kDa. Da in der SDS-PAGE für das CGBG eine Masse von 85 ± 5 kDa bestimmt worden ist, liegt das native CGBG im Blut offensichtlich als größeres Multimer (5-6) von Einheiten vor, die vermutlich ihrerseits stabilere Dimere bilden.

3.4.2 Bestimmung des isoelektrischen Punktes (IEP)

Für die Gewinnung spezifischer Antikörper und Aminosäuresequenzen ist die Kenntnis über die Reinheit des isolierten Proteins von großer Wichtigkeit. Deshalb wurde eine 2-D-Elektrophorese mit der in Abbildung 3-9 gezeigten Herzglycosid-Bindungsglobulin-Fraktion aus der DEAE-Trennung durchgeführt. Diese Analyse schien insbesondere deshalb erforderlich, weil der Peak 2 in der DEAE-Chromatographie leichte Heterogenitäten zeigte. Die 2D-Elektrophorese zeigt, daß die 90 kDa-Bande und die verunreinigende 30 kDa-Bande isoelektrische Punkte in weit unterschiedlichen Bereichen aufweisen und daß beide Proteine heterogen sind.

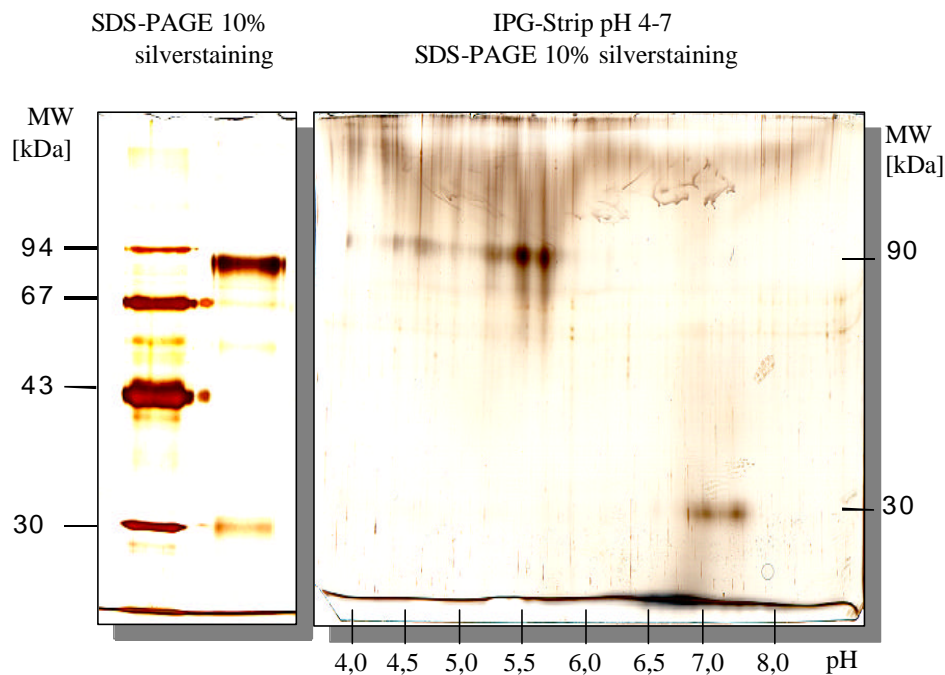


Abbildung 3-14 Links: SDS-Gel mit Silberfärbung; Rechts: 2D-Elektrophorese mit Silberfärbung.

Die 30 kDa-Bande hat isoelektrische Punkte von 7.0 und 7.5; die 90 kDa-Bande von 4,45; 4,6; 5,0; 5,4; 5,5 und 5,65, wobei die letzteren beiden Fraktionen in der Silberfärbung am stärksten ausgeprägt sind. Das Auftauchen mehrerer diskreter Spots zeigt, daß es sich bei den

Heterogenitäten der 90 kDa-Bande in der DEAE-Chromatographie (Abbildung 3-9) vermutlich nicht um eine Proteinverunreinigung sondern sehr wahrscheinlich entweder um unterschiedliche Glykosilierungsmuster eines Grundmoleküls oder um verschiedene Isoformen ein und desselben Proteins handelt.

3.4.3 Bestimmung einzelner Aminosäuresequenzen durch Edman-Abbau

Um die Beziehung des 30 kDa Proteins zu dem 90 kDa Protein zu klären sollten die N-Termini der Proteine verglichen werden. Dazu wurde eine reine CGBG-Fraktion durch SDS-Elektrophorese aufgetrennt und durch Western-Blot auf eine PVDF-Membran geblottet (Kapitel 2.5.1+2.5.3).

Nach dem Western-Blot wurde die Membran ca. 10 Sekunden mit Coomassie angefärbt und sofort mit 50% Methanol gewaschen. Die deutlich sichtbaren Banden bei 30 und 90 kDa wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und solange mit 50% Methanol entfärbt, bis keine Blaufärbung mehr zu sehen war.

Da aus Vorversuchen bekannt war, daß beide Proteine durch Pyroglutamat N-terminal für den Edmanabbau blockiert waren, wurde zunächst mit der Exoproteinase Pyroglutamatase das Pyroglutamat abgespalten. Die Reaktion erfolgte bei 37°C in 24h. Dazu wurde zu jeder Probe 100 µl einer 0,1 mg/ml Enzymlösung in 100mM Tris, pH 8,0 gegeben. Danach wurde 5 mal für 30 min mit Wasser und 5 mal mit 50% Methanol gewaschen.

Die automatische Sequenzierung der zwei Proben erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Karel Bezouska*. Die danach erhaltenen Aminosäuresequenzen lauteten:

30 kDa Protein: ALPNSPVSL

90 kDa Protein: ALPNVETSV

* Dr. Karel Bezouska, Abteilung für Biochemie, Naturwissenschaftliche Fakultät Karls Universität in Prag durchgeführt.

Es galt im weiteren Verlauf noch möglichst viele und aussagekräftige Aminosäuresequenzen zu gewinnen. Dazu wurde das CGBG mit verschiedenen Methode zunächst in Peptide gespalten. Nach der chromatographischen Trennung wurden diese durch Edman-Abbau N-terminal sequenziert.

a) Spaltung mit CNBr

Die Spaltung wurde wie beschrieben durchgeführt (2.8.1). Die Trennung der Peptide erfolgte mittels HPLC auf einer C5-reversed Phase Säule (2.4.2.2).

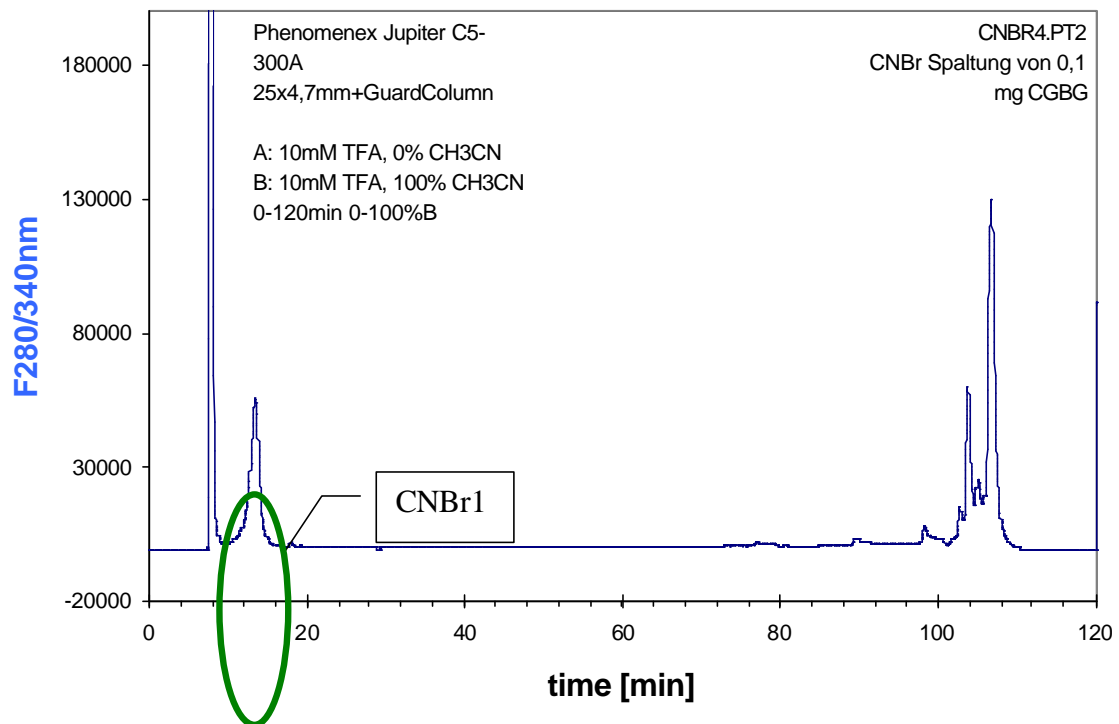


Abbildung 3-15 Die erhaltenen Peptide wurde auf einer Jupiter C5-Säule mit einem Acetonitril/TFA-Gradienten getrennt. Das markierte Peptid wurde ansequenziert.

Das markierte Peptid wurde isoliert und durch einen kommerziellen Dienstleister (WITA Proteomics AG, Berlin) ansequenziert. Die erhaltene Sequenz lautet:

CNBr1 = GKLFNIVNKXQQAL

b) Enzymatische Spaltung durch Endoproteinase Lys-C

Die Spaltung wurde wie beschrieben durchgeführt (2.8.2). Die Trennung der Peptide erfolgte mittels HPLC auf einer C5-reversed Phase Säule (2.4.2.2).

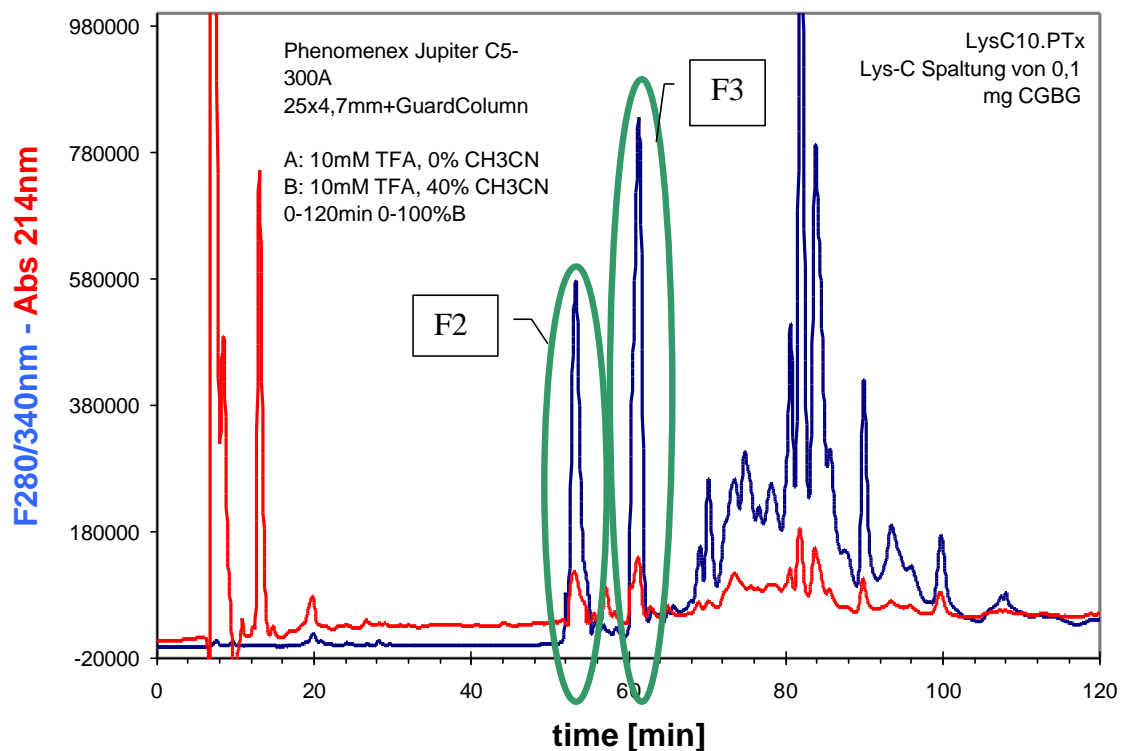


Abbildung 3-16 Die erhaltenen Peptide wurde auf einer Jupiter C5-Säule mit einem Acetonitril/TFA-Gradienten getrennt. Die markierte Peptide wurde ansequenziert.

Die markierten Peptide wurde isoliert und durch einen kommerziellen Dienstleister (WITA Proteomics AG, Berlin) ansequenziert. Die erhaltenen Sequenzen lauteten:

F2 = GFAPADV FVQW

F3 = DLESHYL FERH

3.4.4 Untersuchung spezifischer Spaltmuster einiger Enzyme

Zur Untersuchung der Struktur und Klärung der physiologischen Rolle des Proteins ist es sinnvoll nach spezifischen Spaltmustern durch Enzyme zu suchen. Dazu wurden verschiedene Enzyme eingesetzt, welche nur an wenigen spezifischen Aminosäuresequenzen spalten. Zum Einsatz kamen dazu: N-Glycosidase-F, Papain, Pepsin, Thrombin und Plasmin.

Zur Spaltung wurden jeweils die von Hersteller (Roche, Mannheim) angegebenen Vorschriften verwendet.

Enzym	Glycosidase	Papain	Pepsin	Thrombin	Plasmin
Puffer	20mM EDTA, 0,1% SDS, 50mM TRIS, pH 8,0	50mM TRIS, 2,5mM CaCl ₂ , pH 7,5	50mM NaOAc, 2,5mM CaCl ₂ , pH 2,0	50mM TRIS, 2,5mM CaCl ₂ , pH 7,5	50mM TRIS, 2,5mM CaCl ₂ , pH 7,5
Spaltdauer	16h, 37°C	8h, 37°C	8h, 37°C	16h, 37°C	16h, 37°C
Enzym/Proteinmenge	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10

N-Glycosidase F zeigt ein spezifisches Spaltprodukt bei 75 kDa, was auf einen hohen Kohlenhydratanteil des Proteins hindeutet (vergleiche Kapitel 3.4.5).

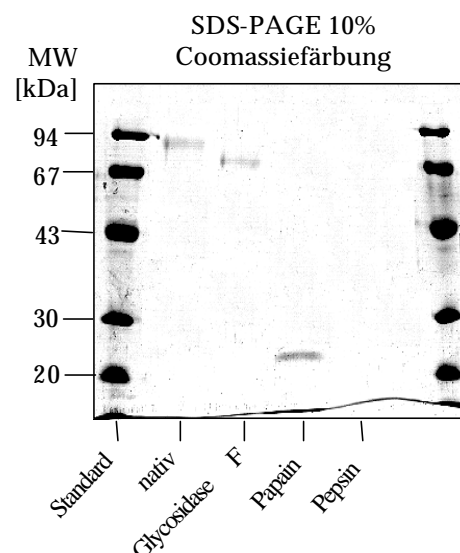


Abbildung 3-17 Spaltmuster einiger Enzyme

Während Pepsin das Protein in kurzer Zeit nahezu vollständig in nicht mehr nachzuweisende Peptide spaltet, liefert einzig Papain ein spezifisches Spaltprodukt mit etwa 25 kDa (Abbildung 3-17). Die Proteinase Thrombin und Plasmin führten unter den gegebenen Bedingungen zu keinerlei Spaltung.

3.4.5 Untersuchung des Glycosylierungsmusters des Herzglykosidbindungsproteins

N-Glycosidase F spaltet alle Asparagin-gebundenen N-Glycanketten vom Protein ab [114]. Inkubiert man das Protein mit 100 U Glycosidase mg CGBG bei pH 8,0 und 0,1% SDS für 16h bei 37°C mit N-Glycosidase-F so erhält man ein Produkt welches im SDS-Gel bei ca 75 kDa läuft (Abbildung 3-18). Vergleicht man also die Massen des deglycosylierten mit dem nativen Protein, so kann man einen Kohlenhydratanteil von 10-15% errechnen.

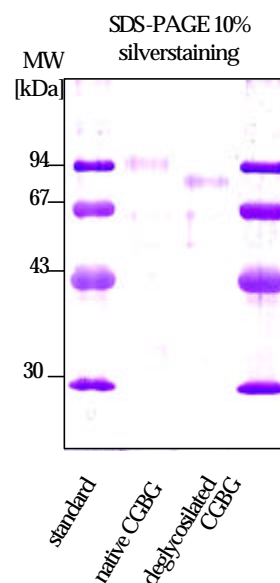


Abbildung 3-18: Das vollständig deglycosylierts CGBG ist um ca. 15% kleiner

Zur Analyse der Ursache der Heterogenität des CGBG-Peaks in der DEAE-Chromatographie (Abbildung 3-9) bzw. in der 2-D-Elektrophorese (Abbildung 3-14) wurde die Zusammensetzung der Glycosidstruktur des CGBG genauer untersucht. Dazu wurde die spezifische Bindung von Lectinen an bestimmte Kohlenhydratstrukturen benutzt. Die hierfür verwendeten Lectine sind mit dem Steroidhaptan Digoxigenin konjugiert, wodurch eine anschließende immunologische Detektion möglich ist.

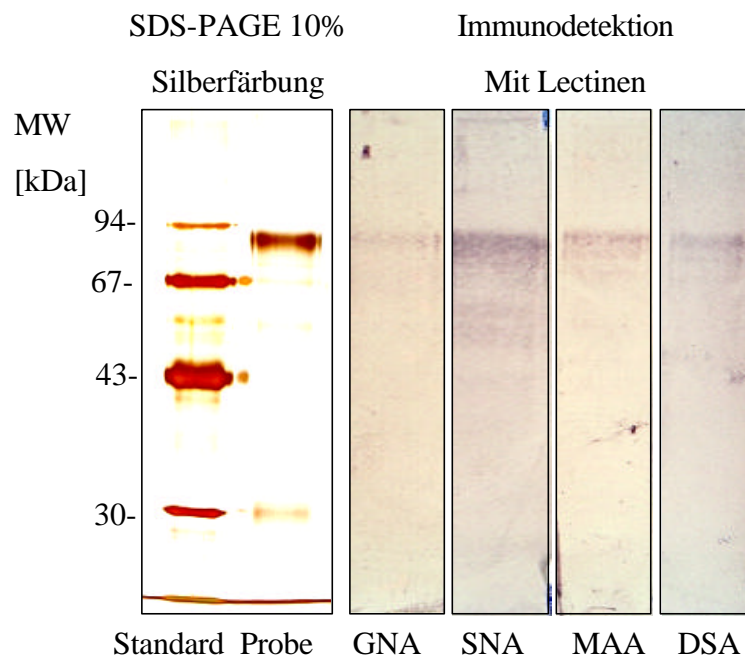


Abbildung 3-19 Links: SDS-Gel mit Silberfärbung; Rechts Wester-Blot mit Lectinen

CGBG zeigte positive Reaktionen mit den Lectinen GNA, SNA, MAA, DSA. Keine Reaktionen ergab sich mit PNA. Die positive Reaktion mit einer Vielzahl von Lektinen bedeutet zunächst, daß das Herzglykosidbindungsprotein aus dem Rinderserum ein Glykoprotein ist. Aufgrund der Lektinspezifität, muß das Glycoprotein CGBG folgende Zuckerstrukturen enthalten: Endständige Mannose, die α (1-3), α (1-6) oder α (1-2) an Mannose gebunden ist (Interaktion mit GNA); Sialinsäure, die α (2-6) und α (2-3) -glykosidisch an Galactose gebunden ist (Interaktion mit SNA und MAA); sowie Gal β (1-4)GlcNAc (Interaktion mit DSA). Da keine Reaktion mit Peanut Agglutinin gefunden wurde, enthält das Herzglykosid-Bindungsprotein des Rinderserums

keine Galactose, die $\beta(1-3)$ glykosidisch an N-Acetyl-Galactosamin gebunden ist. Da die Mengen der Neuraminsäuremoleküle in den verschiedenen Glykoproteinen variierten, kann die Heterogenität der isoelektrischen Punkte in der 2D-Elektrophorese (Abbildung 3-14) wie in der DEAE-Chromatographie durch unterschiedliche Glykosilierungsmuster zustande kommen.

3.4.6 Untersuchung der Funktion des Herzglykosidbindungsproteines

3.4.6.1 Qualitative Bestimmung der Affinität des Herzglykosidbindungsproteins zu unterschiedlichen Steroiden

Die derzeit gültige Lehrmeinung geht davon aus, daß Herzglykoside im Blut an Serumalbumin gebunden transportiert werden. Das durch Affinitätsmarkierung mit HDMA als Test isolierte Protein sollte als Bindungsglobulin Herzglycoside hochaffin binden. Es mußte daher auch funktionell charakterisiert werden. Diese Aufgabe wird derzeit leider noch durch die nicht ausreichende Verfügbarkeit an gereinigtem Bindungsprotein behindert. Mit den bisher verfügbaren Proteinmengen kann jedoch überprüft werden, ob andere Steroidhormone ebenfalls von dem Bindungsglobulin erkannt werden. Hierzu wurde zunächst die Verdrängung des HDMA durch Steroidhormone getestet. Um sicher zu gehen, daß die getesteten Steroide mit dem CGBG ins Gleichgewicht kamen, wurde das isolierte Protein zunächst für 30 min bei 37°C mit verschiedenen Steroiden vorinkubiert und anschließend mit 5 nM HDMA für 15 min. markiert. Für die Vorinkubation wurden die aus *Abbildung 3-20* zu ersiehenden Steroidhormone (in DMSO gelöst) in 10 mM Konzentration verwendet. Die HDMA-markierten Proteine wurden sodann über SDS-PAGE getrennt und die markierten Proteine im Westernblot mittels der Luminiszenzreaktion nachgewiesen. Aus *Abbildung 3-20* wird ersichtlich, daß keines der verwendeten Steroidhormone Östradiol, Testosteron, Progestosteron, Hydrocortisol-2,1 acetat, und Aldosteron mit HDMA um die Herzglykosidbindungsstelle konkurrieren, wohl aber Ouabain.

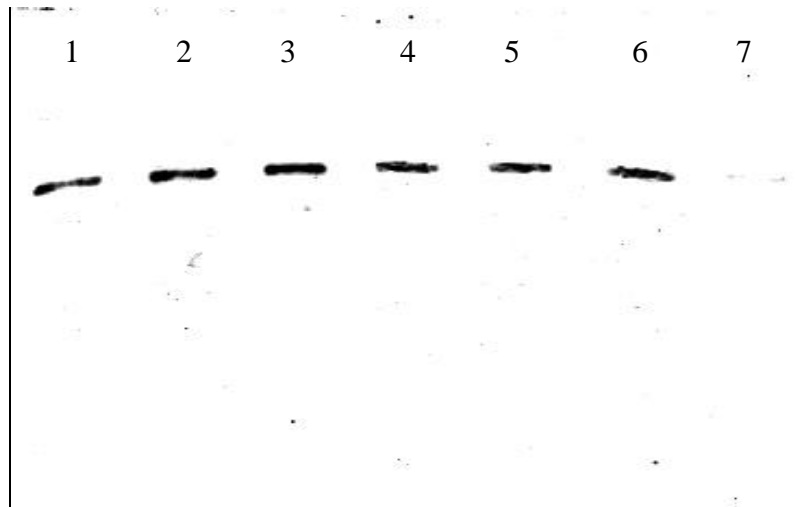


Abbildung 3-20: Western-Blot der Verdrängung der Affinitätsmarkierung mit HDMA durch Steroide (Kapitel 2.7). Es konkurrierten mit der HDMA-Markierung die folgenden Steroide: (1) Östradiol, (2) Testosteron, (3) Progesteron, (4) Hydrocortisol-2,1 acetat, (6) Aldosteron , (7) Ouabain

3.4.6.2 Quantitative Bestimmung der Affinität des Bindungsglobulins zu verschiedenen Herzglycosiden

Für die Bestimmung der Affinität des Progesteronbindungsproteins für Steroidhormone erwies sich die Fluoreszenzlöschung des Tryptophans bei Bindung der Steroidhormone als ein eleganter und leicht durchzuführender Test [91]. Es wurde daher versucht, mit diesem Test auch die Herzglykosidbindung an das Bindungsprotein nachzuweisen. Wie aus der Abbildung 3-21 zu ersehen ist, zeigen steigende Mengen an Ouabain eine immer größere Löschung der Tryptophanfluoreszenz auf.

Gemessen wurden jeweils Proteinproben mit der höchst möglichen Reinheit. Die Proben wurden unmittelbar vor der Messung durch einen 0,45 µm Filter gegeben, um alle möglichen Verunreinigungen auszuschließen.

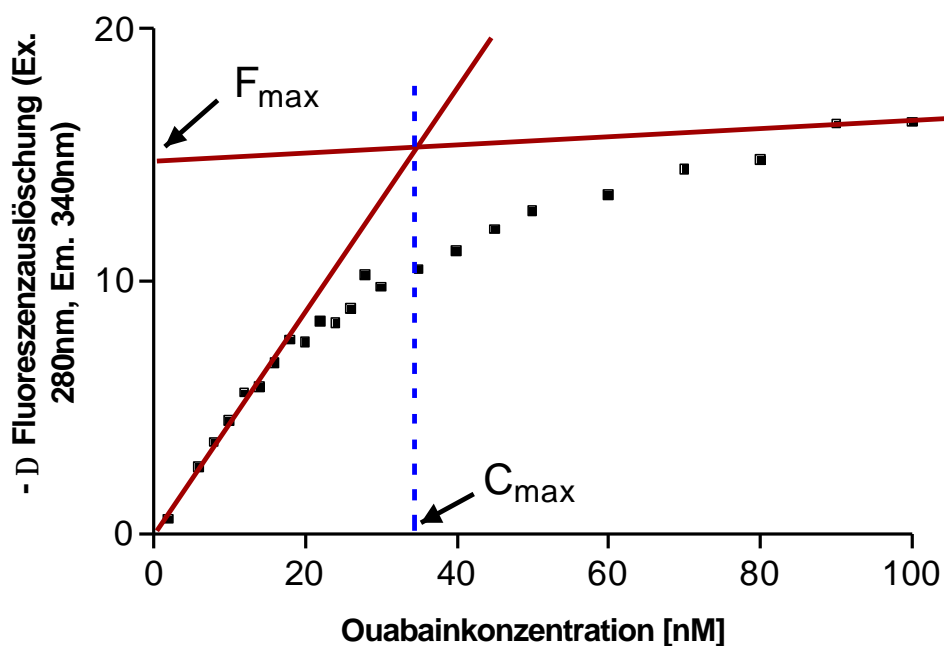


Abbildung 3-21: Auftragung der Rohdaten: Löschung der Tryptophanfluoreszenz (Exikation: 280nm, Emission: 340nm) gegen zugegebene Konzentration an Ouabain.

Wenn mit der Methode von Fortes [107] die bei hohen Ouabainkonzentrationen ersichtliche maximale Fluoreszenz (F_{\max}) und die maximale Bindungskapazität (C_{\max}) durch Anlegen einer Tangente an die Anfangssteigung ermittelt wurde (Abbildung 3-18), konnte aus den Rohwerten nach Gleichung 1 (Seite 48) die Konzentrationen des freien Ouabain und das Verhältnis F/F_{\max} errechnet werden. Die Auftragung dieser Werte ergibt die in Abbildung 3-19 gezeigte Sättigungskurve.

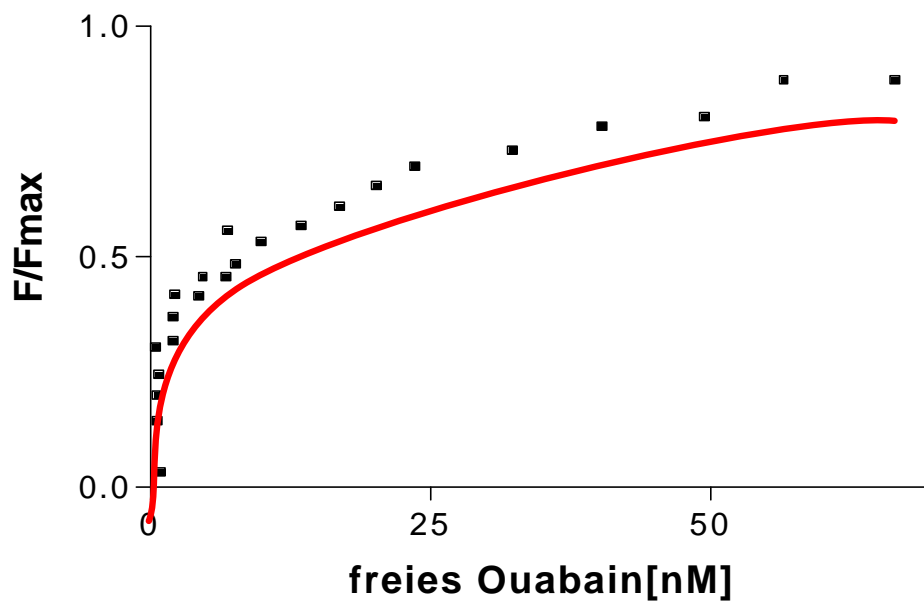


Abbildung 3-22: Kurvenanpassung nach einem Modell für 2 Bindungsstellen

Die Verteilung der Meßwerte beschreibt am besten ein Modell eines Proteines mit 2 interagierenden Herzglykosid-Bindungsstellen. Wenn man ein Adair-Pauling Modell (Gleichung 2, Seite 48) an die Meßpunkte anpaßt, so erhält man für die Dissoziationskonstante $K_d = 2,4 \pm 0,4$ nM und für den Interaktionsfaktor $a = 240 \pm 120$. Hieraus folgt, daß die Dissoziationskonstante des Ouabain-Rezeptorkomplexes der 1. Bindungsstelle $K_{d1} = 2,4 \pm 0,4$ nM ist und die Dissoziationskonstante der zweiten Bindungsstelle $K_{d2} = a \cdot K_d$, also 580 ± 270 nM.

Werden die gleichen Daten nach Scatchard aufgetragen, so wird aus dieser Auftragung (Abbildung 3-20) deutlich, daß die Bindung des Ouabain an das gereinigte Bindungsprotein aus dem Rinderserum nicht mit einer einzigen Bindungsisotherme beschrieben werden kann, sondern daß die Bindung des Herzglykosids mit dem Vorliegen zweier Bindungsstellen beschrieben werden muß. Die auf der Abbildung eingezeichnete Kurve entspricht der vorher durch Kurvenanpassung an das Adair-Pauling Modell erhaltenen; denn durch eine Kurvenanpassung an die Werte dieses Scatchard Plots würden, wie Pingoud et al. Zeigten, [115] sehr große Fehler auftreten.

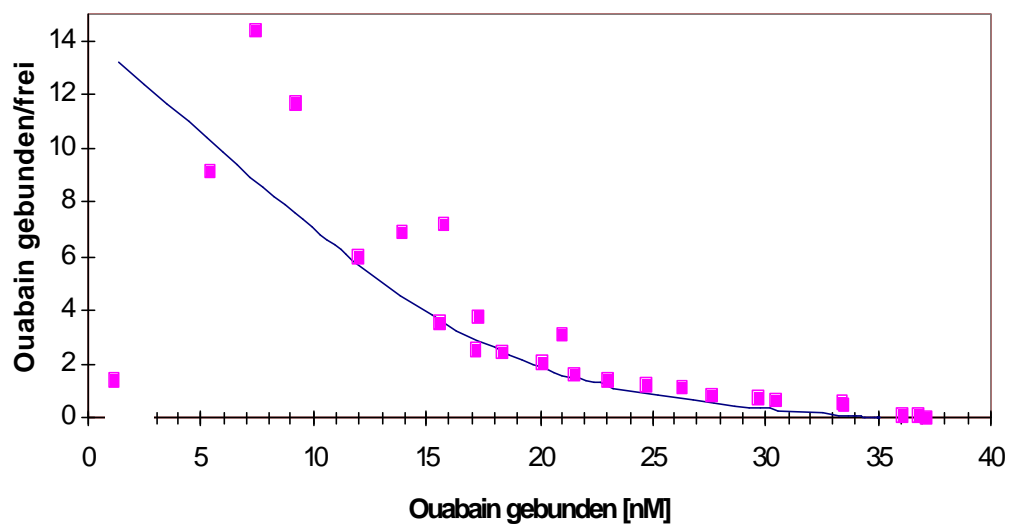


Abbildung 3-23: Scatchard Plot. Die Linie zeigt die aus der Kurvenanpassung (Abbildung 3-22) berechnete Umformung nach Scatchard.

4 Diskussion

Diese Arbeit zeigt, daß aus der Globulinfraktion des Rinderbluts ein Bindungsprotein für Herzglykoside 900 000-fach gereinigt werden kann (Tabelle 3-2). Das Bindungsprotein mit der hohen Ouabain Affinität von $K_d = 2,4 \text{ nM}$ (Abbildung 3-19) erkennt andere Steroidhormone nicht (Abbildung 3-17). Die Spezifität der Herzglykosid-Bindung kann auch durch Affinitätsmarkierung mit dem proteinreaktiven Digoxigenin-derivat HDMA (Abbildungen 3-11, 3-14, 3-17) nachgewiesen werden. Das Herzglykksidbindungsglobulin (CGBG) ist ein Glykoprotein mit dem Molgewicht $85 \pm 5 \text{ kDa}$ der einzelnen aktiven Untereinheit. Es liegt im Blut vermutlich als Pentadimer von $840 \pm 60 \text{ kDa}$ vor (Abbildung 3-12), wobei jeweils 2 Protomere durch Disulfidbrücken verknüpft zu sein scheinen. Entsprechend der multimeren Struktur zeigen die Bindungsstellen für Herzglykoside eine negative Kooperativität ($K_{d1} = 2,4 \text{ nM}$; $K_{d2} = 580 \text{ nM}$; Abbildung 3-19, 3-20). Der Zuckeranteil trägt ca. 10-15 % zum Molekulargewicht bei. Aufgrund der Zuckerspezifität von Lektinen konnten folgende N-glycosidisch gebundene Zuckerstrukturen identifiziert werden: Endständige Mannose, die $\alpha(1-3)$, $\alpha(1-6)$ oder $\alpha(1-2)$ an Mannose gebunden ist (Interaktion mit GNA); Sialinsäure, die $\alpha(2-6)$ und $\alpha(2-3)$ -glycosidisch an Galactose gebunden ist (Interaktion mit SNA und MAA); sowie Gal $\beta(1-4)$ GlcNAc (Interaktion mit DSA) (siehe Abbildung 3-16). Das Protein besitzt einen heterogenen isoelektrischen Punkt zwischen pH 4,5 - 5,5 (Abbildung 3-14). Die Heterogenität ist vermutlich auf unterschiedliche Glykosylierungsmuster zurückzuführen. Eine Analyse der Aminosäuresequenzen zeigte, daß das Herzglykosid-Bindungsglobulin (CGBG) N-terminal durch Pyroglutamat geschützt ist. Nach Deblockierung mit Pyroglutymase kann die Sequenz ALPNVETSV ermittelt werden. Für diese Sequenz, sowie für die weiteren durch Lys-C und CNBr-Spaltung erhaltene Aminosäuresequenz KDLESHYLFERH (Abb. 3-16) und GKLFNIVNKXQQAL (Abb. 3-15) waren in keiner Datenbank (SwissProt, TrEMBL) Proteine mit hoher Analogie zu finden.

Obwohl die Sequenz F2 (Seite: 82) eine starke Homologie zur Sequenz des humanen IgM ausweist, kann aufgrund des derzeitigen Erkenntnisstandes nicht davon ausgegangen werden, daß es sich bei dem CGBG um IgM handelt. So zeigen sowohl Laufverhalten in SDS-PAGE und

2D-Elektrophorese, wie auch die chromatographischen Daten aus den Gelfiltrations-experimenten zwar große Ähnlichkeiten, jedoch keinerlei Übereinstimmung.

Im SDS-Gel läuft humanes IgM bei 95, 60, 35 kDa (CGBG: 85, 50, 30 kDa). In der Gelfiltration zeigt sich für IgM ein Molekulargewicht von $950 \text{ kDa} \pm 70 \text{ kDa}$ (CGBG $840 \text{ kDa} \pm 60 \text{ kDa}$). Der Isoelektrische Punkt des human IgM liegt bei 5,9 - 6,2 (CGBG: 4,5 – 5,5).

Des weiteren läßt sich das IgM durch die „klassischen“ Spaltreaktionen mit den Enzymen Papain und Pepsin in typischer Weise in F_c und F_{ab} Fragmente spalten (116). CGBG hingegen zeigt unter den gleichen Bedingungen keine vergleichbaren Ergebnisse (3.4.4).

Tabelle 4-1 Tabellarische Zusammenstellung des Vergleiches zwischen CGBG und humanes IgM

	CGBG	Human IgM
Molgewicht des nativen Proteins	$840 \text{ kDa} \pm 60 \text{ kDa}$	$950 \text{ kDa} \pm 70 \text{ kDa}$
Molgewicht der größten Einheit	85 – 90 kDa	95 kDa
Molgewicht der kleinsten Einheit	30 kDa (Spaltprodukt ?)	35 kDa
Glycoprotein	N-glycosidisch verknüpft	N-glycosidisch verknüpft
Isoelektrischer Punkt der größten Einheit	4,5 – 5,5	5,9 - 6,2
Isoelektrischer Punkt der kleinsten Einheit	6,9-7,5	5,9 - 6,2
Spaltprodukt mit Papain	20-25 kDa	35 + 30 kDa
Spaltprodukt mit Pepsin	< 10 kDa	35 kDa

Eine Existenz von Herglykosidbindungsproteinen ist bisher für das Krötenblut nachgewiesen worden. Lichtstein et al. [117] haben gezeigt, daß Digitalis-ähnliche Substanzen normale Bestandteile des Bluts von Kröten sind und 30% davon an Plasmaproteine mit einem Molekulargewicht zwischen 48 - 53 kDa gebunden sind. Dieses Protein ist bisher nicht isoliert worden. Es bleibt somit offen, ob dieses Bindungsprotein identisch mit dem hier beschriebenen ist, und ob das kleinere Molgewicht evtl. auf einem proteolytischen Abbau eines größeren

Proteines beruht, wie dies für das CGBG der Fall zu sein scheint (Abbildung 3-5).

Die Existenz eines Herzglykosidbindungsproteins ist auch im Blut von Menschen nachgewiesen worden. Komiyama et al. [118] haben durch Affinitätschromatographie an Ouabain-Sepharose ein Protein von 14,4 kDa gereinigt, das sie durch N-terminale Aminosäuresequenzierung als Plasmin-erzeugtes Bruchstück aus dem Fc-Anteil der schweren Kette des IgG1 identifizierten. Komiyama et al. haben am isolierten Protein nicht überprüft, ob es Ouabain bindet, was sie durch Affinitätsmarkierung mit HDMA und mit der Methode der Tryptophanfluoreszenz-Löschung hätten machen können. Sie haben nur durch einen indirekten Test der Aufhebung der Ouabain-Hemmung der Zellteilung von THP-1-Zellen durch den Fc-Anteil des IgG versucht zu überprüfen, ob das Protein wirklich ein Herzglykosidbindungsprotein ist. Dieser Test ist jedoch sehr wenig spezifisch. Es bleibt zu fragen, ob die Autoren wirklich ein Herzglykosidbindungsprotein isoliert haben: Wie aus der Reinigungsmethode des Herzglykosidbindungsproteins aus Rinderserum deutlich wird, war trotz der Verwendung einer Affinitätschromatographie an einem Antikörper gegen das 50 kDa-Bruchstück des Herzglykosidbindungsproteins die so isolierte CGBG-Fraktion noch mit großen Mengen an IgG verunreinigt (Abbildung 3-9). Diese Verunreinigung konnte erst durch eine DEAE-Ionenaustauscherchromatographie abgetrennt werden. Eine derartige weitere Reinigung des von einer Ouabain-Sepharose isolierten Proteins ist durch Komiyama et al. nicht durchgeführt worden. Es ist also durchaus denkbar, daß die Autoren mit der Ouabain-Sepharose gar keine Affinitätschromatographie sondern eine hydrophobe Chromatographie durchführten; denn in unseren Händen führte die Verwendung der Ouabain-Sepharose-Chromatographie mit vorgereinigten Proteinfractionen zur Isolierung des CGBG aus dem Rinderserum und Schweinenieren und zu Proteinen mit $M_r = 90$ kDa, 50 kDa und 30 kDa. Diese konnten durch HDMA-Affinitätsmarkiert gezeigt werden [113]. Wir bezweifeln somit, daß das von Komiyama et al. isolierte Protein Eigenschaften eines Herzglykosidbindungsproteins hat, da in 2 verschiedenen Säugern CGBG-Proteine mit gleichen Eigenschaften isoliert werden konnten. Es ist jedoch denkbar, daß es sich bei dem ansequenzierten Protein um eine IgG-Verunreinigung handelt, da bei der Reinigung des CGBG aus dem Rinderserum es äußerst schwierig war, solche Verunreinigungen abzutrennen: Bei mehreren Versuchen der Identifizierung des CGBG

durch Aminosäuresequenzierung erhielten wir Hinweise in nicht völlig sauberem CGBG auf eine Verunreinigung durch IgG und IgM.

Es bleibt zu fragen, unter welchen Bedingungen es zur Ausbildung des Herzglykosidbindungsproteins mit einem Molgewicht von 50 kDa kommt [95] (Abbildung 3-5). In manchen Präparationen konnte sogar die 30 kDa-Bande HDMA-markiert werden. Die wahrscheinlichste Erklärung ist, daß es sich bei den Proteinfractionen um Proteolyseprodukte aus dem 90 kDa-Protein handelt. Hierfür spricht auch die Vorliegen sehr ähnlicher N-terminaler Aminosäuresequenzen, die beide durch Pyroglutamat blockiert sind. Die Proteine mit niedrigerem Molekulargewicht entstehen wahrscheinlich trotz des Einschlusses von Protease-Inhibitoren (Complete†, Roche) bei der Proteinreinigung durch mitgeschleppte Proteasen dann, wenn die Proteinreinigung sehr lange dauert. Das mit der zuletzt verwandten Methode 2 isolierte Protein ist dagegen innerhalb von nur 3 Tagen zu erhalten. Das isolierte Protein ist durch keine Proteasen verunreinigt. Es ist auch bei Zimmertemperatur für Wochen stabil, allerdings scheinen sich die Herzglykosid-Bindungseigenschaften des Proteines durch Einfrieren zu ändern, was auf eine Zerstörung des pentadimeren Komplexes hindeutet.

Wie sich aus immunologischen Versuchen mit Antikörpern gegen das gereinigte 90 kDa-Protein ergab (das noch eine schwache Verunreinigung eines 30 kDa-Proteines trägt (Abbildung 3-16)), ist die so erhaltene Proteinfraction immer noch mit weiteren Komponenten verunreinigt; denn die im Kaninchen erhaltenen Antikörper konnten erst nach weiterer Affinitätschromatographie an einer CGBG-haltigen Säule zur quantitativen Bestimmung des CGBG eingesetzt werden. Deshalb wurde in dieser Arbeit keine Reinigungstabelle angegeben, die auch die Konzentration des CGBG direkt mißt. Die spezifischsten Antikörper wurden erhalten, wenn das 90 kDa-Protein aus einem SDS-Gel ausgeschnitten wurde und damit Kaninchen immunisiert wurden. Merkwürdigerweise war dieses Protein wenig immunogen. Dies ist verwunderlich, da sonst Proteinbanden aus einem SDS-Gel sehr immunogen sind. Auch gelang es nicht, Antikörper gegen die N-Terminale Aminosäuresequenz des 90-kDa-Proteins als MAP-Peptid zu erzeugen.

† Enthält: Antipain, Bestain, Chymostain, E-64, Leupeptin, Pepstain, Phosphoramidon, Pefabloc SC, EDTA, Aprotinin, PMSF

Das ist ebenfalls sehr verwunderlich, da sich ohne Schwierigkeiten Antikörper gegen eine falsche N-terminale Aminosäuresequenz erzeugen ließen. Die durch Immunisierung mit der aus einem SDS-Gel ausgeschnittenen 90 kDa-Bande gewonnen Antikörper, die an einer CGBG-Säule weiter gereinigt worden sind, erkennen selbst in hoher Konzentration im Western-Blot nur noch ein Protein mit 90 kDa. Mit Hilfe dieser Antikörper ist es nun möglich einen spezifischen ELISA für CGBG aufzubauen und eine Reinigungstabelle für dieses Protein zu erstellen. Mit dem ELISA sollte es ferner möglich sein, die physiologische Rolle des Bindungsglobulins zu klären. Ebenso sollte es nun durch „screening“ einer Lambda-Phagen-Genbank möglich werden, das Gen für dieses neue Protein zu "fischen" und damit nicht nur Auskunft über die Aminosäurestruktur sondern auch über die Verbreitung des Proteins in den verschiedenen Zellen und Organen von Säugern und in verschiedenen Spezies zu erhalten.



Abbildung 4-1 Links: Bild der CGBG-Kristalle; Rechts: Die Bragg-Reflektion der Kristalle zeigt ein einheitliches Muster. Kristallisationsbedingung: 50 mM MES pH 6,5 , 5 mM Zinksulfat, 12.5% v/v Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 550, Methode: Vapor Diffusion

Mit vielleicht zu erzielenden weiteren Verbesserungen der Reinigung des CGBG sollte es auch möglich sein, an einzelnen Zellen zu überprüfen, ob die Hemmung der Natriumpumpe durch Herzglykoside durch das isolierte Herzglykosid-Bindungsprotein beeinflusst wird. Mit der bisherigen Reinigungsmethode konnte mehr durch Zufall gezeigt werden, daß das CGBG Proteinkristalle bildet. Dazu wurde nach dem letzten chromatographischen Schritt (3.3.2) die

CGBG-Fraktion sofort auf Eis gestellt. Nach etwa 20 min. waren erste feine Kristallnadeln zu sehen. Die so erhaltenen Kristalle wurde in Hamburg von Prof. Christian Betzel[‡] untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß es sich tatsächlich um Proteinkristalle handelte. Das einheitliche Muster der Bragg-Refraktion gibt erste Hinweise auf eine Struktur des Kristalles. Auf eine weitere Erforschung der Kristallstruktur wurde vorerst zu Gunsten der weiteren Klärung der physiologischen Rolle des Herzglykosidbindungsproteins verzichtet.

Die erzielten Ergebnisse können medizinische Bedeutung haben: Obwohl Herzglycoside schon seit nunmehr zwei Jahrhunderten zur Behandlung von Herzinsuffizienz eingesetzt werden, erfolgt die Dosierung traditionellerweise empirisch, was Gefahren in sich birgt. Bei der Therapie mit Digitalis zeigen manche Patienten eine Intoxikation bei Konzentrationen, die der therapeutischen Dosierung bei anderen Patienten entspricht [119]. Besonders gefährlich sind hierbei die daraus resultierenden Herzrhythmusstörungen, welche zum Tod führen können. Die richtige Dosierung ist vor allem deswegen schwierig, weil der therapeutische Index des Digitalis so klein ist. Unter therapeutischem Index versteht man das Verhältnis der therapeutisch hilfreichen zur schädlichen (vergiftenden) Konzentration. Es ist denkbar, daß eine Bestimmung der Blutkonzentration des Herzglykosidbindungsproteins diese Zwischenfälle vermeiden läßt. Es ist auch denkbar, daß die Konzentration des Herzglykosidbindungsproteins die Ausbildung eines Bluthochdrucks beeinflusst; denn das Herzglykosid des endogenen Ouabain ist bei 50% der Patienten mit essentiellen Bluthochdruck mit niedrigem Renin-Spiegel erhöht. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob diese Annahme zutrifft.

Die biologische Bedeutung der sehr hohen Affinität des Herzglykosidbindungsproteins für Herzglycoside, welche 100-fach über der Affinität des Herzglykosidrezeptors der Na/K-ATPase liegt, ist derzeit schwer zu interpretieren. Die hohe Affinität könnte auf eine ganz andere Aufgabe des Proteins hindeuten, welche nicht nur im Transport von Herzglykosiden im Blut besteht. Da Ouabain als endogenes Herzglykosid ein neuartiges Steroidhormon ist, bleibt zu fragen, ob auch dieses neue Steroidhormon nicht analog zu anderen Steroidhormonen über

[‡] Prof. Dr. Christian Betzel, Institut für Physiologische Chemie, Abteilung Strukturanalyse, c/o DESY, Gebäude 22, Notkestr.25, D-22603 Hamburg

einen weiteren spezifischen Rezeptor an der Zellmembran - analog den Vorstellungen von Rosner für Sexualhormone an Prostata- und Brustdrüsenzellen - auf den Stoffwechsel von Zielzellen wirkt. Jedoch muß dieser, mehr auf den Hormon-Mechanismus-orientierter Aspekt dieser Arbeit weiteren Studien vorbehalten bleiben

5 Zusammenfassung

Die pflanzlichen Herzglykoside Ouabain und Digoxin regulieren nach neueren Erkenntnissen in Säugetieren als Steroidhormone der Nebenniere den Salz- und Wasserhaushalt. Da Steroidhormone gebunden an spezifische Bindungsproteine im Blut transportiert werden, sollte ein neu nachgewiesenes Bindungsprotein für Herzglykoside aus Rinderblut gereinigt und weiter charakterisiert werden.

Nach dem Nachweis des Herzglykosidbindungsproteins CGBG durch Affinitätsmarkierung mit dem proteinreaktiven Digoxigeninderivat *N-hydroxysuccinimidyl-Digoxigenin-3-o-methylaminocaproat* (HDMA) gelang es spezifische Antikörper zu gewinnen. Damit konnte das Bindungsglobulin CGBG aus der Globulinfraktion des Rinderserums 900 000-fach gereinigt werden. Hierzu waren eine Vorreinigung des Proteins am Kationenaustauscher CM-Sephadex, eine Affinitätschromatographie an einer spezifischen Antiköpersäule und eine Nachreinigung an der Anionenaustauschersäule Phenomenex Biosep DEAE erforderlich. Die Proteinausbeute der in 3 Tagen durchzuführenden Proteinreinigung betrug 0,0001%.

Das Herzglykosidbindungsprotein ist ein Glykoprotein von Mr 90 kDa in der SDS-PAGE. Der N-Terminus ist durch Pyroglutamat blockiert. Nach Deblockierung mit Pyroglutamase kann durch Edman Abbau die Sequenz ALPNVETSV bestimmt werden. Für sie und eine weitere mit Lys-C erhaltene Sequenz KDLESHYLFERH, sowie eine durch CNBr-Spaltung erhaltene Sequenz GKLFNIVNKXQQAL fanden sich in den SwissProt- und TrEMBL-Datenbanken keine Sequenzhomologien. Das Protein ist somit bisher unbekannt. Der Kohlenhydratanteil des CGBG enthält u.a. Neuraminsäuren, wie durch Interaktion mit verschiedenen Lektinen bestimmt werden konnte. Die N-glycosidisch am Protein gebundenen Kohlenhydrate tragen 10-15% zur Molmasse bei. Unterschiedliche Glykosylierungsmuster erklären die Heterogenität des IEP des nativen Proteins zwischen pH 4,4 und 5,6; denn nach Deglykosylierung ist der IEP 5.6. Mittels Molekularsiebchromatographie ergab sich für das native CGBG eine Molmasse von 820 kDa und unter denaturierende Bedingungen von 180 kDa. Es wird daraus geschlossen, daß das Herzglykosidbindungsprotein ein Pentadimer von 180 kDa ist, in dem die Monomere von 90 kDa durch Disulfidbrücken verknüpft sind.

Mittels Affinitätsmarkierung mit HDMA und mittels Tryptophanfluoreszenzlöschung wurden die spezifische Interaktion des gereinigten Proteins mit Herzglykosiden nachgewiesen. Es gelang 2 Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität von $K_{d1} = 2,4 \text{ nM}$ und von $K_{d2} = 500 \text{ nM}$ nachzuweisen. Das Protein interagiert nicht mit anderen Steroidhormonen.

Gegen das isolierte 90 kDa-Herzglykosidbindungsprotein konnten in Kaninchen spezifische polyklonale Antikörper erzeugt werden. Sie erkannten nur die 90 kDa Proteinbande in einer teilweise gereinigten Proteinfraktion.

6 Summary

In contrast to the general assumption, ouabain and digoxin, which are plant-derived cardiac glycosides, are steroid hormones of the mammals. They regulate the salt and water metabolism. In general, steroid hormones are transported in blood as complexes with steroid binding proteins. Hence it was the intention of this work to identify and to characterize such a binding protein for cardiac glycosidse in bovine blood.

The cardiac glycoside binding globulin (CGBG) identified in a partially purified serum preparation by affinity labeling with the protein-reactive digoxigenin derivative *N-hydroxysuccimidyl-Digoxigenin-3-O-methyl-aminocaproate* (HDMA) was used to immunize rabbits. The antibodies raised were immobilized to prepare an affinity column. This was an essential step to purify CGBG 900,000-fold from bovine blood serum. Purification was performed in 3 days. It included the following steps: Ammonium sulfate precipitation (50%), CM-Sephadex cation exchange chromatography, affinity chromatography on an anti-CGBG Sepharose Fast Flow column, anion exchange chromatography on Phenomenex BioSep DEAE. The protein yield of pure CGBG was 0.0001 %

The isolated cardiac glycoside binding protein shows a band at 90kDa on SDS-PAGE. Its N-terminus is blocked by pyroglutamate. The amino acid sequence ALPNVETSV was determined when CGBG was digested with pyroglutamatase. Other sequences obtained were KDLESHYLFERH (digestion with Lys-C) and GKLFNIVNKXQQAL (hydrolysis with CNBr). All sequences were not found in data banks (SwissProt and TREMBL). CGBG contains N-glycosidic bound carbohydrates which contribute to 10-15% of the molecular mass.

The IEP of the native protein is between pH 5.6 and 4.4. Deglycosilated protein shows only one spot at 75kDa and an IEP at pH 5.6 in 2D-Electrophoresis. The calculated mass from size exclusion chromatography is 820 kDa for the native and 180 kDa for the denatured protein. It is concluded that native CGBG circulates as an pentadimer of 90 kDa monomers that are covalently dimerized by disulfide bonds

The intrinsic tryptophane fluorescence quenching experiment using cardiac glycosides as ligands indicates two binding sites with a high ($K_{D1} = 2.4 \text{ nM}$) and low ($K_{D2} = 500 \text{ nM}$) affinity binding site. Polyclonal antibodies raised in rabbits against the CGBG recognise specifically the cardiac glycoside binding globulin in a semipurified preparation of CGBG.

7 Anhang

7.1 Danksagung:

Diese Arbeit wurde von Januar 1997 bis Juli 2001 am Institut für Biochemie und Endokrinologie der Justus-Liebig Universität in Gießen angefertigt.

Mein Dank gilt insbesondere meinem akademischen Lehrer Prof. Dr. Wilhelm Schoner für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung.

Ferner möchte ich mich bei Prof. Dr. A. Pingoud für die Bereitschaft bedanken, die Arbeit zu begutachten.

Ich danke außerdem allen Mitarbeitern des Institutes für die gute Zusammenarbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft, vor allem aber Dr. Roberto Antolovic, der mich in äußerst kompetenter und engagierter Weise in das Thema eingearbeitet hat.

Diese Arbeit wurde dankenswerterweise durch ein Graduiertenstipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft über das Graduiertenkolleg „Molekulare Biologie und Pharmakologie“ sowie durch Sachmittel aus dem Forschungsprojekt „Analyse der Struktur eines Hemmstoffes der Natriumpumpe aus der Nebenniere des Rindes (Scho 139/20-4)“ sowie „Isolierung, Charakterisierung und Konzentrationsbestimmung eines Transportglobulins für Herzglykoside im Blut (Scho 139/21-2)“ unterstützt.

Besonderer Dank gilt meiner Frau Sabine, die mich durch alle Höhen und Tiefen meiner wissenschaftlichen Laufbahn begleitet hat.

7.2 Lebenslauf

persönliche Daten:

Name: Holger Kost
Geburtsdatum 09.04.69
Geburtsort Butzbach
Familienstand Seit 22.12.1998 verheiratet

schulische Ausbildung:

1975 Einschulung an der Stadtschule in Butzbach
1985 Mittlere Reife an der Stadtschule in Butzbach
1988 Abitur an dem Burggymnasium in Friedberg

universitäre Ausbildung:

10.1989 Beginn des Studiums der Chemie an der Justus Liebig Universität (JLU) in Gießen
12.1992 Vordiplom
06.1995 Abschluß der Diplomhauptprüfung mit Zusatzprüfung in Biochemie
10.1995 - 04.1996 Anfertigung der Diplomarbeit: »*Reinigung eines Transportproteins für endogene Herzglycoside im Rinderserum*« am Institut für Biochemie und Endokrinologie des Fachbereich Veterinärmedizin
01.1997 - 08.2001 Doktorarbeit zum Thema: »*Isolierung und Analyse eines Bindungsglobulins für Herzglycoside aus Rinderblut*«
01.1997 – 05.1999 Stipendiat im Graduiertenkolleg: »*Pharmakologie und molekulare Biologie*« der Justus Liebig Universität.

berufliche Tätigkeiten:

05.1996 – 08.1996 Leitung des Projektes »CD-ROM und ONLINE-Datenbanken Mittelhessischer Hochschulen« am *Transferzentrum Mittelhessen*
09.1996 – 12.1998 Mitarbeit im Team der *Biotechnologie Gesellschaft Mittelhessen mbH* als wissenschaftlicher Berater (Analytik/Bioanalytik)
05.1999 – 08.2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemie und Endokrinologie des Fachbereich Veterinärmedizin an der JLU Giessen
08.2001 Leiter des Labors für Immunologische Analytik der *CHIRON-Behring GmbH* im Marburg

7.3 Publikationsliste

- R. Antolovic, **H. Kost**, D. Linder, M. Linder, D. Thönges, D. Lichtstein and W. Schoner: *Demonstration of a specific Transport Protein for Cardiac Glycosides in Bovine Blood*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 834 (1997) 618-620.
- R. Antolovic, **H. Kost**, M. Mohadjerani, D. Linder, M. Linder and W. Schoner: *A specific binding protein for cardiac glycosides exists in bovine serum*. J. Biol. Chem. 273 (1998) 16259-16264.
- R. Schneider, R. Antolovic, **H. Kost**, B. Sich, U. Kirch, M. Tepel, W. Zidek and W. Schoner: *Proscillaridin A immunoreactivity: Ist purification, transport in blood by a specific protein and its correlation with blood pressure*. Clin. and Exper. Hypertension 20 (1998) 593-599.
- H. Linnertz, **H. Kost**, T. Obsil, A. Kotyk, E. Amler and W. Schoner: *Erythrosin 5'-isothiocyanate labels Cys⁵⁴⁹ in the low-affinity ATP-binding site of Na⁺/K⁺-ATPase*. FEBS-Lett. 441 (1998) 103-105.
- R. Antolovic, E. Hamer, E.H. Serpersu, **H. Kost**, H. Linnertz, Z. Kovarik and W. Schoner: *Affinity labeling with MgATP analogues reveals coexisting Na⁺ and K⁺ forms of the α -subunits of Na⁺/K⁺-ATPase*. Eur J. Biochem. 261 (1999) 181-189.
- R. Antolovic, N. Bauer, M. Mohadjerani, **H. Kost**, H. Neu, U. Kirch, E.-G. Grünbaum and W. Schoner: *Endogenous Ouabain and ist Binding Globulin: Effects of Physical Exercise and Study on the Globulin's Tissue Distribution*. Hypertens. Res. 23, Suppl. (2000) S93-S98.
- Graduiertenkolleg „Molekulare Biologie und Pharmakologie“: *BSE, Creutzfeld-Jakob & Co., oder Ist Wahnsinn übertragbar ?* 1. Auflage Kletsmeier, 1998, ISBN 3-930494-44-2

8 Literaturverzeichnis

- 1 William Withering: *An Account of the Foxglove and some of its Medical Uses*. G.G.J. and J. Robinson, Paternoster Row London, **(1785)**, 207 Seiten
- 2 Garg; R, Gorlin R and Smith T **(1997)** The effect of digoxin mortality and morbidity in patients with heart failure. *New Engl J Med* 336: 525-533.
- 3 Zylka-Menhorn V **(1998)** Herzinsuffizienz. Neue Erkenntnisse sind noch nicht Allgemeingut. *Deutsches Ärzteblatt* 95: B-2479-B2480.
- 4 Fieser L and Fieser M **(1961)** *Steroide*, Verlag Chemie, Weinheim.
- 5 Luckner, M. and Wichtl, M. **(2000)** *Digitalis. Geschichte, Biologie, Biochemie, Chemie, Physiologie, Molekularbiologie, Pharmakologie, Medizinische Anwendung*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart. ISBN 3-8047-1705-5, 352 Seiten.
- 6 Azuma, H., Sekizaki, S., Akizawa, T., Yasuhara, T. and Nakajima, T. **(1985)** Activities of novel polyhydroxylated cardiotonic steroids purified from nuchal glands of the snake, *Rhabdophis tigrinus*. *J. Pharm. Pharmacol.* 38: 388-390.
- 7 Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. and Starke, K. **(1992)** *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 6. Auflage, Wissenschaftsverlag Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich., ISBN 3-411-15026-2, pp. 373-379.
- 8 Smith T W, Butler VP and Haber E **(1969)** Determination of therapeutic and toxic digoxin concentrations by radioimmunoassay. *N Engl J Med* 19: 1150-1156
- 9 K. Kochsieck **(1986)** Importance of serum glycoside concentration. In: *Cardiac Glycosides 1785 - 1985 , Biochemistry - Pharmacology - Clinical Relevance* (Erdmann, E., Greef, K. Skou, J.C., eds.) Steinkopff Verlag, Darmstadt und Springer-Verlag, New York. pp. 407-416.
- 10 Schatzmann HJ **(1953)** Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und Natriumtransport durch die Erythrocytenmembran. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 11, 346-354.
- 11 Repke, K.R.H. and Portius, H.J. **(1963)** Über die Identität der Ionenpumpen-ATPase in der

-
- Zellmembran des Herzmuskels mit einem Digitalis-Rezeptorenzym. *Experientia* 19, 452-458.
- 12 Repke, K.R.H.(1964) Über den biochemischen Wirkungsmechanismus von Digitalis. *Klinische Wochenschrift* 42, 157-165.
- 13 Sweadner, K.J. (1989) Isoenzymes of Na⁺/K⁺-ATPase . *Biochim.Biophys. Acta* 988, 185-220.
- 14 Sweadner, K.J. (1993) Multiple Digitalis Receptors. A Molecular Perspective. *Trends Cardiovasc. Med.* 3, 2-6.
- 15 Sweadner, K.J. (1995) Na,K-ATPase and its isoforms, In: *Neuroglia* (Kettenmann, H. and Ranson, B.R., eds.) Oxford University Press, New York, pp. 259-272.
- 16 James PF, Grupp IL, Grupp G, Woo AL, Askew GR, Croyle ML, Walsh RA and Lingrel JB (1999) Identification of a specific role for the Na,K-ATPase alpha 2 isoform as a regulator of calcium in the heart. *Mol. Cell* 3: 555-563.
- 17 Blaustein MP, Juhaszova M and Golovina VA (1998) The cellular mechanism of the action of cardiotonic steroids: A new hypothesis. *Clin and Exper Hypertension* 20: 691-703.
- 18 Juhaszova M, Blaustein M.P. (1997) Na⁺ pump low and high ouabain affinity α subunit isoforms are differently distributed in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1800-1805.
- 19 Habermehl, G.G., (1994) Exocytosis of toxins in amphibians and fishes, *Ann N Y Acad Sci* 710:149-52.
- 20 Snyder SH, Innis RB. (1979) Peptide neurotransmitters. *Annu Rev Biochem.* 48:755-82.
- 21 Mechoulam, R. and Fride, E. (2001) A hunger for cannabinoids. *Nature* 410, 763-765
- 22 Snyder, S.H. (1984) Drugs and neurotransmitter receptors in the brain, *Science* 224, 22-31
- 23 Luckner, M., Wichtl, M. (2000) Digitalis. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart*, 1, 228-242
- 24 Porto, A.M., Baralle, F.E. and Gros, E.G. (1972) Biosynthesis of bufadienolides in toads. 3. Experiments with (2- 14 C)mevalonic acid, (20- 14 C)3 -hydroxy-5-pregnen-20-one and (20- 14 C)cholesterol. , *J. Steroid Biochem.* 3, 11-17.
- 25 Szent-Györgyi A (1953) Chemical Physiology of Contraction in Body and Heart Muscle.

New York, Academic Press.

- 26 De Wardener HE. **(1991)** Kidney, salt intake and Na⁺,K⁺-ATPase inhibitors in hypertension: 1990 Cocoran lecture. *Hypertension* 17: 830-836.
- 27 Hamlyn JM, Blaustein MP, Bova S, DuCharme DW, Harris DW, Mandel F, Mathews WR and Ludens JH **(1991)** Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6259-6263.
- 28 Schneider R, Wray V, Nimtz M, Lehmann WD, Kirch U, Antolovic R and Schoner W **(1998)** Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump. *J Biol Chem* 273: 784-792.
- 29 Arnaud M **(1888)** Sur la composition élémentaire de la strophanthine cristallisée, extraite du *Strophanthus Kombé*. *CR Acad Sci Paris* 107: 179-182.
- 30 Jacobs WA and Bigelow NM **(1932)** Ouabain or g-strophanthin. *J Biol Chem* 96: 647-658.
- 31 Kawamura A, Guo J, Itagaki Y, Bell C, Wang Y, Hauptert Jr GT, Magil S, Gallagher RT, Berova N, Nakanishi K **(1999)** On the structure of endogenous ouabain. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6654-6659.
- 32 Tymiak AA, Norman JA, Bolgar M, DiDonato GC, Lee H, Parker WL, Lo L-C, Berova N, Nakanishi K, Haber E, Hauptert GT Jr **(1993)** Physicochemical characterization of a ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8189-8193.
- 33 Zhao N, Lo LC, Berova N, Nakanishi K, Tymiak AA, Ludens JH, Hauptert GT **(1995)** Na,K-ATPase inhibitors from bovine hypothalamus and human plasma are different from ouabain: Nanogram scale CD structural analysis. *Biochemistry* 34: 9893-9896.
- 34 Laredo J, Hamilton JP, Hamlyn JM **(1995)** Secretion of endogenous ouabain from bovine adrenal cells: Role of zona glomerulosa and zona fasciculata. *Biochem Biophys Res Commun* 212: 487-493.
- 35 Laredo J, Hamilton BP, Hamlyn JM **(1994)** Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells. *Endocrinology* 135: 794-797.
- 36 Laredo J, Shah JR, Lu Z, Hamilton BP, and Hamlyn JM **(1997)** Angiotensin II stimulates secretion of endogenous ouabain from bovine adrenal cortical cells via angiotensin II

-
- receptors. *Hypertension* 29: 401-407.
- 37 Hamlyn JM, Lu Z, Manunta P, Ludens JH, Kimura K, Shah JR, Laredo J, Hamilton JP, Hamilton MJ and Hamilton BP (1998) Observations on the nature, biosynthesis, secretion and significance of endogenous ouabain. *Clin & Exptl Hypertension* 20: 523-533.
- 38 Perrin A, Brasmes B, Chambaz EM, Defaye G (1997) Bovine adrenocortical cells in culture synthesize an ouabain-like compound. *Molec Cell Endocrinol* 126: 7-15.
- 39 Boulanger BR, Lilly MP, Hamlyn JM, Laredo J, Shurtleff D, Gann DS (1993) Ouabain is secreted by the adrenal gland of the awake dogs. *Am J Physiol* 264: E413-E419.
- 40 Schoner W, Antolovic R, Kost H, Mohadjerani M, Li S-Q, Bauer N, Neu H, Grünbaum E-G, Kirch U and Paetzold R (1999) Endogenous cardiotonic steroids and its binding globulin. *Japanese J Pharmacol* 79, Suppl I: 30 P (abstract S16-5).
- 41 DiBartolo V, Balzan S, Pieraccini L, Ghione S, Pegorana S, Biver P, Revoltella R and Montali U (1995) Evidence for an endogenous ouabain-like immunoreactive factor in human newborn plasma coeluting with ouabain on HPLC. *Life Sci* 57: 1417-1425.
- 42 Manunta P, Stella P, Rivera R, Ciurlino D, Cusi D, Ferrandi M, Hamlyn JM, Bianchi G (1999) Left ventricular mass, stroke volume, and ouabain-like factor, *essential hypertension*. 34: 450-456.
- 43 Gottlieb SS, Rogowski AC, Weinberg M, Krichten CM, Hamilton BC, Hamlyn JM (1992) Elevated concentrations of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure. *Circulation* 86: 420-425.
- 44 Kochsiek K, Larbig D and Haasis R. (1977) Klinik und Therapie der Digitalisintoxikation. *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.* 83: 99-115.
- 45 Hulthen UL, Bolli P, Kiowski W and Bühler FR (1984) Forearm vasoconstrictor response to ouabain: studies in patients with mild and moderate essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 6: S75-S81.
- 46 Manunta P, Evans G, Hamilton BP, Gann D, Resau J and Hamlyn JM (1992) A new syndrome with elevated plasma ouabain and hypertension secondary to an adrenocortical tumor (Abstract). *J Hypertens* 10 (suppl 4): S27.

-
- 47 Masugi F, Ogihara T, Hasegawa T, Sagakuchi K, Kumahara Y, **(1988)** Normalization of high plasma level of ouabain-like immunoreactivity in primary aldosteronism after removal of adenoma. *J Human Hypertension* 2: 17-20.
- 48 Hamlyn JM, Blaustein MP, Bova S, DuCharme DW, Harris DW, Mandel F, Mathews WR and Ludens JH **(1991)** Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6259-6263.
- 49 Manunta P, Rogowski AC, Hamilton BP, Hamlyn JM **(1994)** Ouabain-induced hypertension in the rat: relationships among plasma and tissue ouabain and blood pressure. *J. Hypertens.* 12:549-560
- 50 Pamnani MB, Chen S, Yuan CM, Haddy FJ **(1994)** Chronic blood pressure effects of bufalin, a sodium-potassium ATPase inhibitor in rats. *Hypertension* 23(Suppl. 1):I-106-I109
- 51 Huang BS, Kudlac M, Kumarathasan R, Leenen FH **(1999)** Digoxin prevents ouabain and high salt intake-induced hypertension in rats with sinoaortic denervation. *Hypertension* 34:733-738
- 52 Manunta P, Rogowski AC, Hamilton BC, Hamlyn JM: Chronic hypertension induced by ouabain but not digoxin in the rat: Antihypertensive effect of digoxin. International Symposium on Natriuretic and Digitalis-like Factors, Chitose, Hokkaido Japan, 24. August 1999, Abstract 13 **(1999)**.
- 53 Ferrari P, Torielli L, Ferrandi M, Padoani G, Duzzi L, Florio M, Conti F, Melloni L, Vesci L, Corsico N and Bianchi, G **(1998)** PST 2238: A new antihypertensive compound that antagonizes the long-term pressor effect of ouabain, *J Pharmacol Exptl Therapeut* 285: 83-94.
- 54 Quadri L, Bianchi G, Cerri A, Fedrizzi G, Ferrai P, Gobbini M, Melloni P, Sputore S, Torri M **(1997)** 17 β -(3Furyl)-5 β -androstane-3 β -14 β -17 α -triol (PST 2238). A very potent antihypertensive agent with a novel mechanism of action, *J Med Chem* 40: 1561-1564.
- 55 Goto A, Ishiguro T, Yamada K, Ishii M, Yoshioka M, Eguchi C, Shimura M and Sugimoto T **(1990)** Isolation of a urinary digitalis-like factors indistinguishable from digoxin, *Biochem Biophys Res Commun* 173: 1093-1101.

-
- 56 Shaikh IM, Lau BWC, Siegfried BA and Valdes R **(1991)** Isolation of digoxin-like immunoreactive factors from mammalian adrenal cortex. , *J Biol Chem* 266: 13672-13678.
- 57 Qazzaz, H.M.A.M., Goudy, S.L. and Valdes, R.J. **(1996)** Deglycosylated products of endogenous digoxin-like immunoreactive factor in mammalian tissue , *J.Biol. Chem.* 271: 8731-8737.
- 58 Qazzaz, H.M.A.M., Jortani, S.A., Poole, J.M. and Valdes, R.J. **(1996)** Evidence for presence of a reduced form of digoxin-like immunoreactive factor (dihydro-DLIF) in mammalian tissues. , *Clin. Chem.* 271, 8731-8737.
- 59 Valdes, R., Jr. **(1985)** Endogenous digoxin-immunoactive factor in human subjects, *Fed. Proc.* 44, 2800-2805
- 60 Valdes, R., Hagberg, J. M., Vaughan, T. E., Lau, B. W. C., Seals, D. R. & Ehsani, A. A. **(1988)** Endogenous digoxin-like Immunoreactivity in blood is increased during prolonged strenuous exercise, *Life Sci.* 42, 103-110
- 61 Bagrov, A.Y., Feodorova, O.V., Maslova, M.N., Roukoyatkina, N.I., Ukhanova, M.A. and Zhabko, E.P. **(1991)** Effect of endogenous digoxin-like factor and digoxin antibody on myocardial Na⁺, K⁽⁺⁾-pump activity and ventricular arrhythmias in acute myocardial ischaemia in rats. , *Cardiovasc. Res.* 25, 371-377.
- 62 Adair, C. D., Buckalew, V., Taylor, K., Ernest, J. M., Frye, A. H. & Veille, J. C. **(1996)** Elevated endoxin-like factor complicating a multifetal second trimester pregnancy: Treatment with digoxin-binding immunoglobulin, *Am. J. Nephrol.* 16, 529-531.
- 63 Goodlin, R. C. (1988) Antidigoxin antibodies in eclampsia, *New Engl. J. Med.* 318, 518-519.
- 64 Kaide, J. I., Ura, N., Torii, T., Nagakawa, M., Takada, T. & Shimamoto, K. **(1999)** Effect of digoxin-specific antibody Fab fragment (Digibind) on blood pressure and renal water. Sodium metabolism in 5/6 reduced renal mass hypertensive rats, *Am. J. Hypertens.* 12, 611-619.
- 65 . Bagrov, A. Y., Feodorova, O. V., Dmitrieva, R. I., Howald, W., N., Hunter, A., P., Kuznetsova, E. A. & Shpen, V. M. **(1998)** Characterization of a urinary bufodienolide

-
- Na⁺,K⁺-ATPase inhibitor in patients after acute myocardial infarction, *Hypertension*. 31, 1097-1103.
- 66 Bagrov, A. Y., Roukayatkina, N. I., Fedorova, O. V., Pinaev, A. G. & Ukhanova, M. V. (1993) Digitalis-like and vasoconstrictor effects of endogenous digoxin-like factor(s) from the venom of *Bufo marinus* toad, *Eur. J. Pharmacol.* 234, 165-172.
- 67 Lopatin, D.A., Ailamazian, E.K., Dmitrieva, R.I., Shpen, V.M., Fedorova, O.V., Doris, P.A. and Bagrov, A.Y. (1999) Circulating bufodienolide and cardenolide sodium pump inhibitors in preeclampsia. , *J. Hypertens.* 17, 1179-1187.
- 68 Bagrov, A.Y., Fedorova, O.V., Austin-Lane, J.L., Dmitrieva, R.I. and Andersen, D.E. (1995) Endogenous marinobufagenin-like immunoreactive factor and Na⁺, K⁺ ATPase inhibition during voluntary hypoventilation. , *Hypertension* 26, 781-188.
- 69 Fedorova, O.V., Anderson, D.E. and Bagrov, A.Y. (1998) Plasma marinobufagenin-like and ouabain-like immunoreactivity in adrenocorticotropin-treated rats. , *Am. J. Hypertens.* 11, 796-802.
- 70 Bagrov, A.Y. and Fedorova, O.V. (1998) *J. Hypertens.* 16, 1953-1958.
- 71 Bagrov, A.Y., Lakatta, E.G. and Fedorova, O.V. (2000) Marinobufagenin, an endogenous bufadienolide sodium pump inhibitor. In: *Na/K-ATPase and Related ATPases* (Taniguchi, K. and Kaya, S., eds). Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 647-654.
- 72 Lichtstein, D., Gati, I., Samuelov, S., Berson, D., Rozeman, Y., Landau, L. & Deutsch, J. (1993) Identification of digitalis-like compounds in human cataractous lenses, *Eur. J. Biochem.* 216, 261-268.
- 73 Lichtstein, D., Levy, T., Deutsch, J., Steinitz, M., Samuel, Z., Zigler, J., Russel, P. (2000) Involvement of Na⁺/K⁺-ATPase inhibitors in cataract formation. In: *Na/K-ATPase and Related ATPases* (Taniguchi, K. and Kaya, S., eds). Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 639-646.
- 74 Sich, B., Kirch, U., Tepel, M., Ziedek, W. & Schoner, W. (1996) Pulse pressure correlates with a proscillaridin A immunoreactive compound, *Hypertension*. 27, 1073-1078.
- 75 Li, S.-Q., Eim, C., Kirch, U., Lang, R. E. & Schoner, W. (1998) Bovine adrenals and

-
- hypothalamus are a major source of proscillaridin A- and ouabain-immunoreactivities, *Life Sci.* 62, 1023-1033.
- 76 Kometiani P, Li J, Gnudi L, Kahn BB, Askari A, Xie Z. (1998) Multiple signal transduction pathways link Na⁺/K⁺-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*; 273(24):15249-56
- 77 Kriegstein J (1981) Plasma Protein binding of Cardiac Glycosides, *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol 56/II, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York, pp 95-104.
- 78 Daiger, S. P., Schanfield, M. S., und Cavalli-Sforza, L. L. (1975) Human group-specific component (Gc) proteins bind vitamin D and 25- hydroxyvitamin D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 2076-2080.
- 79 Haddad, J. G., und Chyu, K.J. (1971) 25-Hydroxycholecalciferol-binding globulin in human plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, 248, 471-481.
- 80 Pearce, C.J., Byfield, PGH. (1986) Free hormone assays and thyroid function. *Ann. Clin. Biochem.* 23, 230-237.
- 81 Pearce, C.J., Byfield, PGH. (1986) Free hormone assays and thyroid function. *Ann. Clin. Biochem.* 23, 230-237
- 82 Retetoff, S. (1989) Inherited thyroxine-binding globulin abnormalities in man. *Endocrine Rev.* 10, 275-292
- 83 Benvenga, S., Gregg, RE., Robbins, J. (1988) Binding of thyroid hormones to human plasma lipoproteins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67, 6-16
- 84 Bartalena, L., Robbins, J. (1992) Variations in thyroid hormone transport proteins and their clinical implications. *Thyroid* 2, 237-245
- 85 Hammond, G.L. (1990) Molekular properties of corticosteroid binding globulin and the sex-steroid binding proteins. *Endocrine Rev.* 11, 65-79
- 86 Rosner, W. (1990) The function of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: recent advances. *Endocrine Rev.* 11, 80-91
- 87 Cooke, N.E., Haddad, J.G. (1989) Vitamin D binding protein (Gc globulin). *Endocrine. Rev.*

-
- 10, 294-307
- 88 Bartalena, L. (1990) Recent achievements in studies on thyroid hormone-binding proteins. *Endocrine Rev.* 11, 47-64
- 89 Klosterman, L.L., Murai, J.T., und Siiteri, P.K. (1986) Cortisol levels, binding, and properties of corticosteroid-binding globulin in the serum of primates. *Endocrinology*, 118, 424-434
- 90 Milgrom, E., Allouch, P., Atger, M., und Baulieu, E. E. (1973) Progesterone-binding plasma protein of pregnant guinea pig. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* , 248, 1106-1114
- 91 Westphal, U. (1971) Steroid-Protein Interactions. Springer-Verlag, Berlin
- 92 Pardridge, W.M. (1987) Plasma protein-mediated transport of steroid and thyroid hormones. [Review] *Am. J. Physiol.* 252, (*Endocrinol Metab* 15): E157-164
- 93 Baulieu, E.E. (1986) Steroid hormone binding plasma proteins and their intra- and extra-cellular congeners, binding proteins of steroid hormones. *Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd.*, 149, 1-11.
- 94 Czako, G. (1996) Free Hormone measurements, In: Immunoassay Diamandis, E.P and Christopoulos, T.K., eds) *Academic Press, San Diego*, pp. 423-481.
- 95 Antolovic, R., Kost, H., Linder, D., Linder, M., Thönges, D., Lichtstein, D. & Schoner, W. (1997) Demonstration of a specific transport protein for cardiac glycosides in bovine blood, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 834, 618-620.
- 96 Komiyama, Y., Nishimura, N., Nishino, N., Okuda, K., Munakata, M., Kosaka, C., Masuda, M. & Takahashi, H. (1998) Purification and characterization of ouabain-binding protein in human plasma, *Clin. & Exper. Hypertens.* 20, 683-690
- 97 Schoner, W. (2001) Endogenous cardiotonic steroids, *Cell. mol. Biol.* 47, 273-280.
- 98 Lichtstein, D., Gati, J. & Ovadia, H. (1993) Digitalis-like compounds in the toad *Bufo viridis*: Interactions with plasma., *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22, S102-S105.
- 99 Watson, D.H. Harvey M.J. Dean (1978) The selectiv retardation of NADP⁺ depended dehydrogenase by immobilized Procion HE-3B, *Biochem. J.* 173, 591-596

-
- 100 Pharmacia (1993) Monoclonal Antibody Purification *Pharmacia LKB Biotechnology* 18-1037-46
- 101 Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Struktural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- 102 Görg, A , Postel, W: Günther, S. (1988) The Current State of Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients *Electrophoresis* 9, 531-546
- 103 Lowry O.H. Rosenbrough N.J. Farr A.L. Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin-Phenol reagent, *J. Biochem* 193, 264-275
- 104 Moore, W.J. and Hummel, D.O. Physikalischge Chemie. 4. Aufl., (1986) Walter de Gruyter, Berlin, New York
- 105 Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 7 ;72:248-54
- 106 Warburg, O.,Christian W. (1941) *Biochem. Z.* 310, 384
- 107 Fortes, G. (1986) A Fluorometric method for the determination of funktional NaK-ATPase and cardiac glycoside receptors, *Analytical Biochemistry* 158, 454-462
- 108 Scatchard, G. (1949) *Ann. Y. Acad. Sci.* 51, 660-672
- 109 Kellner, R. (1994) Chemical and Enzymatic Fragmentation of Proteins. In: *Microcharakterisation of proteins, Kellner, Lottspeich, Meyer, VCH Weinheim*
- 110 Stone, K.L. LoPresti, M.B., Williams, K.R. (1990) Enzymatic digestion of proteins an HPLC peptide isolation in the sub-nanomolar range *in: Methodology in Biochemistry p. 181 CRC Press, Boca Raton, Florida*
- 111 Carey, F.A. and Sunderberg, R.J. (1990) Advanced Organic Chemistry , Part A and B (Third Edition). Plenum Press, New York
- 112 R. Antolovic, H. Kost, M. Mohadjerani, D. Linder, M. Linder and W. Schoner (1998) A specific binding protein for cardiac glycosides exists in bovine serum. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 16259-16264.
- 113 Maryam Mohadjerani (1999) Analyse der Gewebeverteilung und der Eigenschaften eines

-
- Bindungsglobulins für Herzglykoside des Schweins *Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Justus-Liebig-Universität*
- 114 Chu, E. K. **(1986)** Requirements of cleavage of high mannose oligosaccharides in glycoproteins by peptide N-glycosidase F *J. Biol. Chem.* 261, 172-177
- 115 Peters, F., Pingoud, A. **(1979)** Numerical analysis of binding studies: a direct procedure avoiding the pitfalls of a Scatchard analysis of equilibrium data for unknown binding models, *Int. J. Bio-Medical Computing* (10) 401-415
- 116 Boguslawski, S.J., Ledden, D.J., Fredrickson, R.A. **(1988)** Improved procedure for preparation of F(ab')₂ fragments of mouse IgG's by papain digestion. *Journal of Immunological Methods*, 120 51-56
- 117 Lichtstein, D., Gati, J. und Ovadia, H. **(1993)** Digitalis-like compounds in the toad *bufo viridis*: interactions with plasma proteins. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22: 102-105.
- 118 Komiyama, Y., Nishimura, N., Nishino, N, Okuda, K., Munakata, M, Kosaka, C., Masuda, M. and Tkahashi, H. **(1998)** Purification and characterization of ouabain binding protein in human plasma. *Clin. Exptl. Hypertension* 20, 683-690.
- 119 Kochsiek, K. **(1986)** Importance of serum glycoside concentrations. In: Cardiac glycosides 1785-1985, *Biochemistry, Pharmacology, Clinical Relevance* (Erdmann, E., Greef, K. and Skou, J.C., eds) Steinkopff-Verlag, Heidelberg, pp 407-416.